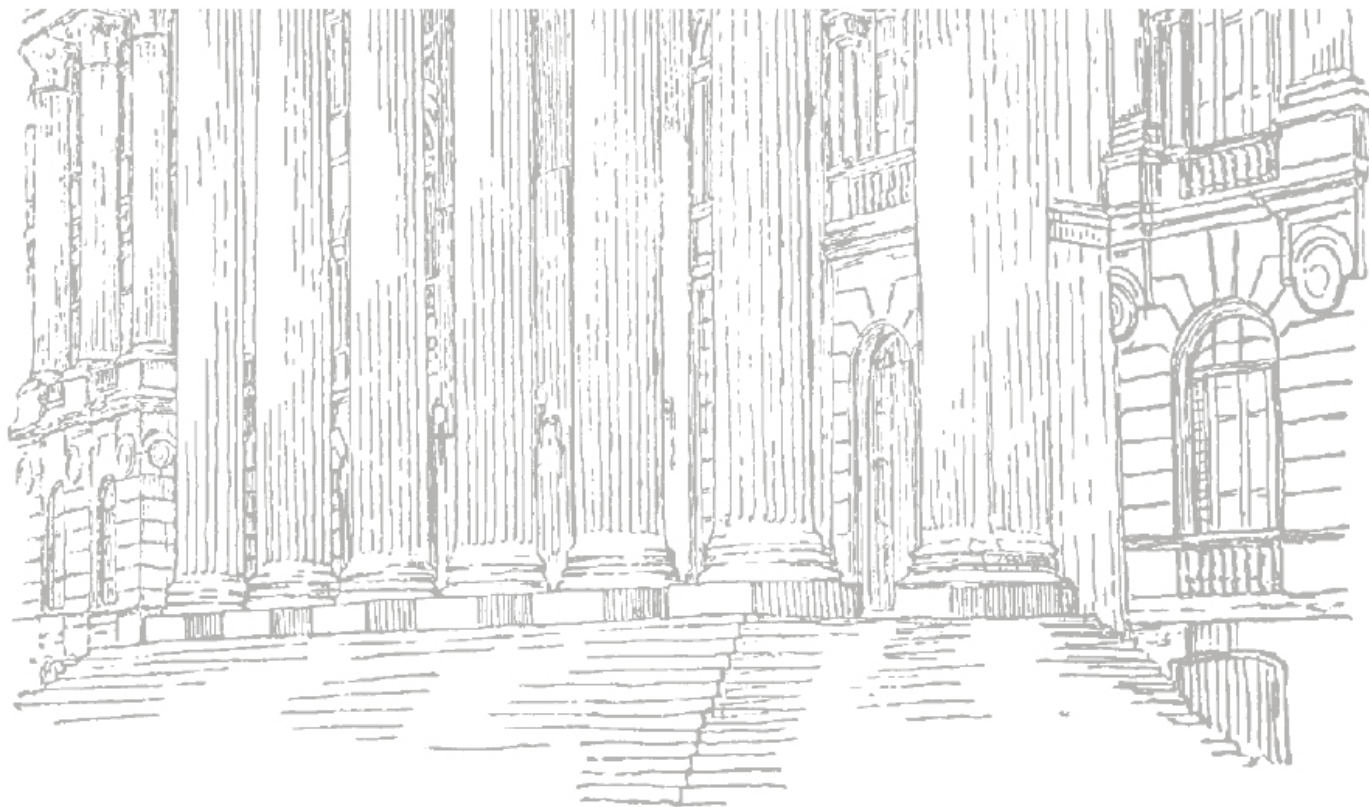




TESE DE DOUTORADO



DANIELE CHAVES MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIQUÍMICA E BIOLÓGICA DE FOSFOLIPASES
PRESENTES EM VENENO DE *Loxosceles intermedia* e *Lonomia obliqua*.**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^o. Dr. Silvio Sanches Veiga
Co-Orientador: Prof^o. Dr. Andrea Senff Ribeiro
Co-Orientador: Prof^a. Dra. Olga Meiri Chaim

**CURITIBA
2011**

Moreira, Daniele Chaves

Caracterização Bioquímica e Biológica de Fosfolipases presentes em venenos de *Loxosceles intermedia* e *Lonomia obliqua* / Daniele Chaves Moreira. – Curitiba, 2011.

300f.:il. (algumas color.)

Orientador: Silvio Sanches Veiga

Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

1. Veneno. 2. Fosfolipases. 3. Atividade Biológica.

***Tese preparada no Departamento de
Biologia Celular durante o Curso de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular
e apresentada à Universidade Federal do
Paraná, para a obtenção do título de Doutor
em Biologia Celular e Molecular.***

Este trabalho de tese foi desenvolvido dentro das normas impostas pela legislação atual, no que diz respeito ao uso de organismos geneticamente modificados, com o certificado de qualidade em biossegurança N°028/97 no D.O.U em 31/03/1998.

Este trabalho de tese está inserido no projeto “*BIOLOGIA CELULAR, BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR DE VENENOS*” registrado no BANPESQ/THALES N°2000008118, e também certificado pelo IBAMA.

Este trabalho de tese foi aprovado e certificado pelo Comitê de Ética de Experimentação em Animais (CEEAA) N°245, assim como pelo Comitê de Ética de Experimentação em Humanos (CEP – Biológicas) ambos da Universidade Federal do Paraná.

Daniele Chaves Moreira

*Farmacêutica e Bioquímica graduada pela
Universidade Federal do Paraná (2002-2007).*

*Mestre em Biologia Celular e Molecular pela
Universidade Federal do Paraná (2007-2008).*

O trabalho desenvolvido não teria sido possível sem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), assim como do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Este trabalho é dedicado ao meu pai, ao qual sou intimamente ligada, que no período de desenvolvimento deste trabalho me ajudou com paciência, carinho e compreensão, demonstrando que a superação nos momentos difíceis vale à pena, por estarmos ao lado de quem realmente se importa com nosso sucesso.

***Ao meu orientador Silvio Sanches Veiga por
ter me inspirado e por me fazer acreditar
que sob a direção de um forte general, não
haverá jamais soldados fracos.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Dr. Silvio Sanches Veiga, ***“ao Mestre com carinho”*** pela competência com que orientou esta tese e o tempo que generosamente me dedicou transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com paciência, lucidez e confiança. Pelo acesso que me facilitou a uma pesquisa mais alargada e enriquecedora e pela sua crítica sempre cabível, como construtiva, estou-lhe muito, muito grata.

Ao Prof^o. Dr. Waldemiro Gremski, pela co-orientação de todos esses anos, mas, sobretudo pela amizade e pelo carinho.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Olga Meiri Chaim, por compartilhar comigo seu tema de pesquisa, sendo uma interlocutora disposta a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante o processo de reflexão. Por ser uma interlocutora paciente e generosa e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade, principalmente. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntas.

A Prof^a. Dra. Andrea Senff Ribeiro, que sempre de alguma forma me prestigiou, sendo nas discussões de resultados, nas apresentações realizadas e corrigindo os meus textos.

À Prof^a. Dra. Juliana Ferreira de Moura, pela amizade e companhia valorosa, minha grande admiração por sua disposição. Minha querida amiga que sempre me tratou com muito afeto e apoio científico, principalmente pela confiança em mim depositada e no meu trabalho.

À Prof^a. Dra. Larissa Alvarenga agradeço as ricas sugestões a esse trabalho, assim como sua compreensão e estimulação a seguir em frente.

A Dra. Luíza Helena Gremski pela colaboração para a execução dessa tese, pela disposição, pela amizade, pela compreensão, pelo apoio para a realização desse projeto, bem como por seus questionamentos e contribuições nas etapas de Clonagem e Expressão das toxinas.

Aos meus amigos do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos: Ana Carolina, Adriano, Aline, Dilza, Daniela Buch, Fernando Matsubara, Fernanda Nunes, Gabriel, Larissa, Marianna Bóia, Mariana Magnone, Marta, Matheus, Thiago Silva, Thiago de Mari, Valéria, Youssef. Àqueles que estarão mais um tempo por lá e também àqueles que por aqui passaram e que já batem asas pela vida, a minha gratidão e meu carinho por absolutamente **todos** os momentos. Saibam que os terei sempre comigo, guardados do lado esquerdo do peito.

Em especial as minhas amigas, Valéria, Mariana Magnone e a Larissa pela amizade, cumplicidade e ombro fiel e acolhedor.

Ao Professor André Fuly, que gentilmente colaborou e cedeu seu reagente para a execução desse trabalho.

Aos Professores Silvio Marques Zanata, Lia Nakao e Adriana Mercadante pelos ensinamentos úteis, conselhos, sugestões, amizade e pelas inúmeras vezes que me emprestaram seus reagentes.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia como a Márcia Appel, Chelin, Bia, Michele, Heloisa, Katya, Luiz e Rodrigo pela amizade, companhia valorosa e pela ajuda em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Imunoquímica como a Janaína, Alessandra e João pela amizade.

Ao Professor Rosalvo Fogaça pela amizade, pelos ensinamentos, pela discussão dos resultados e pelo empréstimo dos bloqueadores de canais iônicos. Ao seu aluno e meu amigo Robson Olivotto, pela amizade, pela companhia e pela ajuda nos cursos que fizemos juntos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Exercício Marcelo, Jaisson, Adriana, Gina.

Aos amigos dos Laboratórios da Professora Dorly, da Professora Célia e do Professor Edvaldo, Carolina, Simone, Ana Paula, Jennifer, Gustavo, Rafael e Lucas pela amizade e companheirismo.

À TODOS os amigos do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular da UFPR pela agradável convivência durante estes anos, em especial, aos colegas do Instituto Carlos Chagas, onde sempre fui muito bem recebida. Não posso deixar de agradecer ao meu amigo Felipe Leprevost por todos os momentos que passamos juntos.

À Edla Marília Rigoni do **Centro de Saúde Ambiental – SESA** e ao Marcelo Luiz Vettorello do **Centro de Vigilância Epidemiológica – SMS**, pela gentileza e disponibilização dos dados.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelo empenho na melhoria deste curso.

À Secretária do Curso de Pós-Graduação, Marlene B. de Camargo, pela incansável disposição.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e seus dedicados funcionários, pelo fornecimento e manutenção dos animais utilizados neste trabalho e a atenção de sempre.

Às minhas eternas amigas Caroline, Fernanda, Gisele, Grace e Juliana Pamplona, que sempre incentivaram e participaram da realização de um sonho, que é a UFPR. Muito Obrigada pela nossa "terapia em grupo" me fazendo rir das coisas boas e também dos dramas - até porque é bom saber rir das nossas próprias trapalhadas. E me orgulho de poder manter essa amizade de tantos anos.

À minha melhor amiga há 10 anos, minha irmã siamesa dos tempos da graduação, a Vivian. Alguém que sempre me disse que “lá” tem uma porta destrancada só esperando você abri-la. Muito Obrigada pela companhia, amizade e amor incondicional. Aqui deixo minha eterna gratidão.

A todos os meus familiares, tios, tias, primos e primas, dindo, dinda, por sempre acreditarem em mim e proporcionarem tantos momentos felizes na minha vida. Em especial às minhas primas Patrícia e Milena, pelo ombro amigo e fiel.

Aos meus pais agradeço a vocês por tudo que hoje sou pelos valores morais e amor incondicional. Se hoje eu sou uma mulher independente, de caráter e personalidade é porque me ensinaram assim.

Ao meu pai Roberto, por me fazer enxergar a verdade, a aceitar o que sou e buscar meus objetivos. Meu porto seguro, meu ídolo que sempre nas piores horas dizia que eu precisava ser forte, porque para tudo tem solução. E principalmente, OBRIGADA por ter me dado a oportunidade de ser um pedacinho de você e por ser um pedaço de mim.

À minha mãe, porque me deu não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo.

Ao meu único Irmão, Roger, pelo apoio e amizade.

Eu creio que esta parte de agradecimentos é uma tarefa difícil, pois muitas vezes cometemos injustiças e por esquecimento não mencionamos nomes de pessoas que também contribuíram para o trabalho. **ENTÃO, A TODOS QUE DE ALGUMA FORMA CONTRIBUÍRAM PARA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO, MEU MUITO OBRIGADO E ESPERO QUE DE ALGUMA FORMA POSSA RETRIBUIR TODA A ATENÇÃO, CONFIANÇA E RESPEITO.**

Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho.

Thomas Jefferson

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

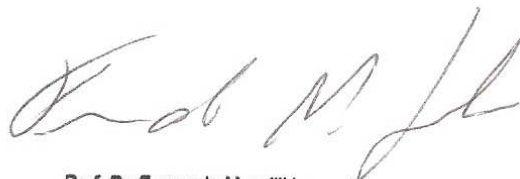
Universidade Federal do Paraná

Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Daniele Chaves Moreira** no dia 31 de agosto de 2011, na Universidade Federal do Paraná, defendeu sua tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: "**Caracterização Bioquímica e Biológica de fosfolipases presentes em veneno de *Loxoceles intermedia* e *Lonomia obliqua***", com a banca examinadora constituída, pelos professores: Dra. Kátia Cristina Barbaro (Instituto Butantan), Dr. Stênio Perdigão Fragoso (Instituto Carlos Chagas), Dra. Maria Eliane Merlin Rocha (Universidade Federal do Paraná), Dra. Adriana Frohlich Mercadante (Universidade Federal do Paraná) e Dr. Silvio Sanches Veiga (Universidade Federal do Paraná, como orientador e presidente da Banca Examinadora), e tendo sido Aprovada. A solicitação de emissão do Diploma de Doutor em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Esta Declaração tem validade por 60(sessenta) dias, a partir da data da mesma.

Curitiba, 31 de agosto de 2011.



Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 168050

RESUMO

No Brasil, existem vários animais de importância médica, as aranhas do gênero *Loxosceles* e as lagartas do gênero *Lonomia* em especial apresentam índices alarmantes de acidentes com humanos. Esses animais peçonhentos e traumatizantes podem provocar morbidez importante e algumas vezes mortalidade em humanos. Após a picada da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*), as vítimas apresentam lesões cutâneas necróticas ao redor da picada e, em menor frequência, sinais sistêmicos tais como insuficiência renal, coagulação intravascular disseminada e hemólise. Enquanto, o contato acidental com as cerdas pontiagudas contendo o veneno da lagarta (*Lonomia obliqua*) leva a dor em queimação, edema, eritema e em alguns casos hemorragias, hemólise e insuficiência renal. Neste presente trabalho, nós caracterizamos bioquímica e biologicamente seis isoformas recombinantes e uma isoforma mutada de fosfolipase-D presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*. O tratamento de eritrócitos provenientes de sangue humano com as toxinas induziu experimentalmente hemólise direta de modo concentração- e tempo-dependentes. Os eritrócitos expostos à toxina fosfolipase-D recombinante apresentaram alterações morfológicas no tamanho e na forma, agregação dos *lipid rafts* e externalização de fosfatidilserina. A lise direta dos eritrócitos induzida pela fosfolipase-D recombinante depende da espécie do animal testado, já que eritrócitos obtidos a partir de humanos, de coelhos e de carneiros sofreram hemólise em uma porcentagem muito superior do que a observada com eritrócitos de cavalo. Em ensaios de microscopia confocal e imunofluorescência indireta, bem como em citometria de fluxo, utilizando uma toxina fluorescente recombinante GFP-fosfolipase-D mostraram a ligação direta da toxina à membrana dos eritrócitos humanos. Além disso, observou-se que esta enzima promove a hidrólise de fosfolipídios como a esfingomielina e lisofosfatidilcolina da membrana dos eritrócitos, formando ácido lisofosfatídico e ceramida-1-fosfato respectivamente, que são capazes de ativar uma série de enzimas intracelulares que culminam na morte e ruptura dos eritrócitos. Além disso, o tratamento com a fosfolipase-D recombinante estimula o influxo de cálcio detectado através de uma sonda fluorescente sensível ao cálcio (Fluo-4). Este influxo de cálcio mostrou ser mediado por canais de cálcio do tipo-L. Fazendo o uso de alguns inibidores sugere-se duas possíveis vias que explicam a hemólise induzida pela fosfolipase-D. A primeira através da formação de ácido lisofosfatídico e ativação dos receptores LPA1/LPA3 acoplados a proteína G e a segunda pela formação de ceramida-1-fosfato e da sua interconversão em ceramida, esfingosina e esfingosina-1-fosfato. Desse modo, os resultados aqui descritos fornecem evidências de que as fosfolipases-D do veneno de *L. intermedia* desencadeiam a hemólise direta sobre de eritrócitos humanos de maneira dependente da atividade catalítica e que a ruptura das células ocorre com a formação de metabolitos bioativos que ativam cascatas de sinalização. Por fim, foi clonada uma nova fosfolipase A₂ presente nas cerdas de *Lonomia obliqua*. Esta nova toxina foi parcialmente caracterizada, porém futuramente será feita uma avaliação mais aprofundada das suas características bioquímicas, estruturais e biológicas. Logo, esse estudo sobre as fosfolipases presente nos venenos de *Loxosceles intermedia* e de *Lonomia obliqua* pode auxiliar o melhor entendimento dos efeitos fisiopatológicos desenvolvidos nos acidentes com esses animais, assim como para o desenvolvimento de novas manobras terapêuticas e aplicações biotecnológicas e industriais.

ABSTRACT

In Brazil, there are several animals of medical importance, the spider of the genus *Loxosceles* and caterpillars of the genus *Lonomia* have particularly alarming rates of accidents with humans. These traumatic and venomous animals may provoke important morbidity and sometimes mortality in humans. After the bite of the brown spider (*Loxosceles intermedia*), can occur necrotic skin lesions around the bite and, less frequently, systemic signs such as renal failure, disseminated intravascular coagulation and hemolysis. While accidental contact with sharp bristles containing the poison of a caterpillar (*Lonomia obliqua*) leads to burning pain, swelling, redness and sometimes bleeding, hemolysis and renal failure. In this work, we characterized biochemical and biologically six recombinant isoforms and a mutated isoform of phospholipase-D present in the venom of *Loxosceles intermedia*. Treatment of erythrocytes from human blood with toxins experimentally induced hemolysis so concentration-and time-dependent. Erythrocytes exposed to the toxin recombinant phospholipase-D showed morphological changes in size and shape, aggregation of lipid rafts and externalization of phosphatidylserine. The direct lysis of erythrocytes induced by recombinant phospholipase-D depends on the species of animal tested, since red blood cells obtained from human, rabbit and sheep suffered hemolysis in a much higher percentage than that observed with horse erythrocytes. In studies of indirect immunofluorescence and confocal microscopy and flow cytometry, using a recombinant GFP-fluorescent toxin phospholipase-D showed the direct connection of the toxin to the membrane of human erythrocytes. In addition, we observed that this enzyme promotes the hydrolysis of phospholipids such as sphingomyelin and lysophosphatidylcholine erythrocyte membrane, forming lysophosphatidic acid and ceramide-1-phosphate respectively, which are capable of activating a number of intracellular enzymes that culminate in the death and rupture of red blood cells. In addition, treatment with recombinant phospholipase-D stimulates the influx of calcium detected by a calcium-sensitive fluorescent probe (Fluo-4). This influx of calcium was shown to be mediated by calcium channel L-type. Making use of some inhibitors suggests that two possible ways to explain the hemolysis induced by phospholipase-D. The first through the formation of lysophosphatidic acid LPA1/LPA3 and activation of receptors coupled to G protein and second by the formation of ceramide-1-phosphate and its interconversion of ceramide, sphingosine and sphingosine-1-phosphate. Thus, the results described here provide evidence that phospholipase-D from the venom of *L. intermedia* trigger directly on hemolysis of human erythrocytes in a manner dependent on the catalytic activity and that disruption of the cells occurs with the formation of bioactive metabolites that activate signaling cascades. Finally, we cloned a new phospholipase A₂ present in *Lonomia obliqua* bristles. This new toxin has been partially characterized, but the future will be a further evaluation of its biochemical, structural and biological characteristics. Therefore, this study on phospholipases present in the venoms of *Loxosceles intermedia* and *Lonomia obliqua* can help better understand the pathophysiological effects developed in accidents with these animals, as well as the development of new therapeutic maneuvers and industrial and biotechnological applications.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA: Albumina de soro bovino
B.O.D: Biological Oxygen Demand (Estufa incubadora microprocessada)
C1P: Ceramida-1-fosfato
cDNA: DNA complementar
CEEA: Comissão de ética e experimentação animal
COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação animal
EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético
GPCRs: receptores celulares para fosfolipídios associados à proteína G
IgG: Imunoglobulina do Tipo G
IRA: Insuficiência renal aguda
kDa: Quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons).
LALP: Metaloprotease do tipo astacina.
LiRecDT: *Loxosceles intermedia* Dermonecrotic Recombinant Toxin.
LPA: Ácido lisofosfatídico
MDCK: Madin-Darby Canine Kidney Epithelial cell line
µg: Microgramas
mL: Mililitro
mM: Milimolar
µL: Microlitro
PAGE-SDS: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
pH: Potencial hidrogeniônico
PLA₂: Fosfolipase A₂
PLD: Fosfolipase-D
PMSF: Fenilmetilsulfonil Fluoreto
RAEC: Rabbit Aortic Endothelial cell line
RBCs: Red Blood Cells (eritrócitos)
SFB: Soro Fetal Bovino
S1P: Esfingosina-1-Fosfato
SMase-D: Atividade Esfingomielinásica-D

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Locais de destino das clivagens promovidas pelas fosfolipases.....	22
Figura 2: Estruturas de alguns lipídios presentes em membrana.....	23
Figura 3: A inter-relação e interconversão das vias de sinalização através de metabólitos lipídicos.....	24
Figura 4: Ilustração de animais peçonhentos que apresentam atividade fosfolipásica em seus venenos.	25
Figura 5: Distribuição geográfica das espécies de aranhas-marrons, encontradas no Brasil.....	30
Figura 6: Aspecto das aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	31
Figura 7: Aranha-marrom gênero <i>Loxosceles</i> sp.....	32
Figura 8: Imagem das genitálias das espécies de <i>Loxosceles</i>	33
Figura 9: Detalhes anatômicos da espécie <i>Loxosceles intermedia</i>	35
Figura 10: Ooteca e ovos de <i>Loxosceles intermedia</i>	36
Figura 11: Loxoscelismo cutâneo.....	44
Figura 12: Evolução da picada da aranha-marrom “ <i>L. reclusa</i> ”.....	46
Figura 13: Proporções relativas de cada grupo de toxinas produzidas na glândula de veneno da <i>Loxosceles intermedia</i>	49
Figura 14: Alinhamento estrutural entre a LiRecDT1 de <i>Loxosceles intermedia</i> (classe II) e a PLD I de <i>Loxosceles laeta</i> (classe I).....	55
Figura 15: Diferenças entre os aminoácidos na entrada do sítio ativo da PLD Classe IIa (átomos em branco) e Classe IIb (átomos em amarelo).....	56
Figura 16: Análise da superfície das classes I e II de PLD com vista acessível ao solvente.....	58
Figura 17: Mecanismo catalítico da fosfolipase-D.....	59
Figura 18: Ciclo de vida das Lagartas do gênero <i>Lonomia</i>	66
Figura 19: Fase larval da <i>Lonomia obliqua</i>	66
Figura 20: Distribuição geográfica das espécies de <i>Lonomia</i> presentes no Brasil.....	67
Figura 21: Detalhe do conjunto de cerdas (Scoli) da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	73

Figura 22: Ilustração do acidente com cerdas, indutores de inflamação e reações imunes na pele.....	74
Figura 23: Vitima do contato na região cervical com a lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	75
Figura 24: Reação catalisada pela PLA ₂	79
Figura 25: Mecanismo geral de hidrólise das Fosfolipases A ₂	80
Figura 26: Estrutura da fosfolipase A ₂ presente no veneno de abelha (<i>Apis mellifera</i>).....	82
Figura 27: Metabólitos formados através da atividade da PLA ₂	85
Figura 28: Sítios alvos da prostaglandinas.....	86
Figura 29: Perfil protéico da membrana eritrocitária humana.....	116
Figura 30: Modelo de membrana plasmática, mostrando o metabolismo da esfingomielina e o mecanismo pelo qual seus metabólitos podem ser transportados através da membrana.....	125
Figura 31: Ilustração esquemática do possível mecanismo molecular, pelo qual a LiRecDT1 desencadeia a morte dos eritrócitos.....	131
Figura 32: RNA total das cerdas produtoras de veneno de <i>L. obliqua</i>	141
Figura 33: 3' RACE da fosfolipase A ₂ <i>L. obliqua</i>	143
Figura 34: Alinhamento das sequências nucleotídicas de <i>Lonomia obliqua</i> semelhantes à fosfolipase A ₂	144
Figura 35: Sequência codificante teórica da LoPLA ₂ (<i>Open Reading Frame</i>).....	145
Figura 36: A fosfolipase A ₂ de <i>Lonomia obliqua</i> pertence ao grupo III de PLA ₂ (cd04705).....	146
Figura 37: Similaridade da fosfolipase A ₂ de <i>L. obliqua</i> com outras fosfolipases A ₂ de artrópodes.....	147
Figura 38: Cladograma que ilustra a semelhança entre algumas fosfolopases A ₂ de artrópodes.....	148
Figura 39: Seqüência nucleotídicas e aminoacídicas da Fosfolipase A ₂ de <i>Lonomia obliqua</i>	150
Figura 40: Fosfolipase A ₂ de <i>Lonomia obliqua</i> (LoPLA ₂).....	151
Figura 41: Digestão dupla.....	153
Figura 42: PCR de colônia. PCR da reação de ligação com <i>primers</i> universais do vetor.....	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aranhas pertencentes ao gênero <i>Loxosceles</i> (Heineken & Lowe, 1832), presentes no Brasil.....	29
Tabela 2: Evolução da lesão em função do tempo após o acidente loxoscélico.....	42
Tabela 3: Acidentes por aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> : classificação quanto à gravidade, manifestações clínicas tratamento geral e específico.....	45
Tabela 4: Visão geral das famílias de toxinas encontradas nas aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	48
Tabela 5: Lagartas pertencentes ao gênero <i>Lonomia</i> presentes no Brasil.....	65
Tabela 6: Seqüência nucleotídica da toxina LiRecDT1 clonada a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de <i>L. intermedia</i> e a dedução da sua seqüência aminoacídica.....	100
Tabela 7: Identidade aminoacídica entre a fosfolipase A_2 de <i>L. obliqua</i> com outras de diferentes espécies.....	149

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Mapa da distribuição dos acidentes loxoscélicos por coeficiente de incidência média nos municípios do Estado do Paraná, registrados de 1993 a 2000.....	37
Gráfico 2: Série histórica dos acidentes com aranha-marrom “ <i>Loxosceles sp.</i> ”.....	38
Gráfico 3: Número de acidentes com aranha marrom “ <i>Loxosceles sp.</i> ” por Regional de Saúde entre os anos de 2009 e 2010.....	38
Gráfico 4: Número de acidentes com aranha-marrom “ <i>Loxosceles sp.</i> ” de acordo com o local da picada, registrado no ano de 2010.....	39
Gráfico 5: Número de acidentes com aranha-marrom “ <i>Loxosceles sp.</i> ” de acordo com o sexo da vítima, registrados no ano de 2010.....	40
Gráfico 6: Número de acidente com aranha-marrom “ <i>Loxosceles sp.</i> ” de acordo com a faixa etária da vítima entre os anos de 2009 e 2010.....	40
Gráfico 7: Número de acidentes com aranha-marrom de acordo com a gravidade do quadro desenvolvido após a picada.....	41
Gráfico 8: Incidência de acidentes com <i>Lonomia obliqua</i> no estado do Paraná nos últimos dois anos.....	68
Gráfico 9: Distribuição da lagarta <i>Lonomia</i> e acidentes no estado do Paraná de 1989 a 2008*.....	68
Gráfico 10: Incidência de acidentes com <i>Lonomia sp.</i> no estado do Paraná entre 1995 a 2001, de acordo com o sexo.....	69
Gráfico 11: Incidência de acidentes com <i>Lonomia sp.</i> no estado do Paraná entre 1995 a 2001, de acordo com a faixa etária da vítima.....	69
Gráfico 12: Incidência de acidentes com <i>Lonomia sp.</i> no estado do Paraná entre 1995 a 2001, de acordo com o local de contato.....	70
Gráfico 13: Coeficiente de letalidade por animal peçonhento no estado do Paraná de 1989 a 2000.....	70
Gráfico 14: Distribuição das toxinas presente na cerda de <i>L. obliqua</i>	77
Gráfico 15: Atividade hemolítica do ácido lisofosfatídico.....	110
Gráfico 16: Inibição da atividade hemolítica pelo antagonista do receptor LPA1/LPA3.....	112

Gráfico 17: Inibição da atividade hemolítica pelo tratamento dos eritrócitos com metil- β -ciclodextrina (M β CD).....	114
Gráfico 18: Inibição da atividade hemolítica pelo tratamento dos eritrócitos com nistatina.....	115
Gráfico 19: Inibição da atividade hemolítica pela remoção dos ácidos siálicos da superfície dos eritrócitos.....	118
Gráfico 20: Redução da atividade enzimática da LiRecDT1 pela remoção dos ácidos siálicos da superfície dos “ghost” eritrocitário.....	119
Gráfico 21: Inativação dos receptores GPCR pela remoção dos ácidos siálicos da superfície dos eritrócitos.....	120
Gráfico 22: Envolvimento da Fosfolipase A ₂ e da Ciclooxigenase na hemólise induzida pela LiRecDT1.....	122
Gráfico 23: Participação da Fosfolipase C endógena na hemólise induzida pela LiRecDT1.....	124
Gráfico 24: Participação de fosfatases intracelulares na hemólise induzida pela LiRecDT1.....	127

SUMÁRIO

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE GRÁFICOS	xxi
1. INTRODUÇÃO	21
CAPITULO I	
1.1 Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	27
1.2 Epidemiologia	36
1.3 Acidente loxoscélico	41
1.4 Características bioquímicas do veneno loxoscélico	46
1.5 Fosfolipases – D (PLD)	54
1.6 A Atividade hemolítica do veneno.....	59
CAPITULO II	
1.7 Lagartas do gênero <i>Lonomia</i>	64
1.8 Epidemiologia	67
1.9 O acidente com as lagartas do gênero <i>Lonomia</i>	71
1.10 Características bioquímicas do veneno de lagartas.....	75
1.11 Fosfolipase A ₂ presente nas cerdas de <i>Lonomia obliqua</i>	78
1.12 Hemólise intravascular após contato com lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	82
2. OBJETIVOS	87
2.1 Objetivos Gerais	87
2.2 Objetivos Específicos	87
3. RESULTADOS.....	89
A - Item 1: Identificação de um efeito hemolítico direto dependente da atividade catalítica Induzida pela Fosfolipase-D (Toxina dermonecrótica) do veneno da aranha-marrom.....	
	89

B - Item 2: A relação entre cálcio e o metabolismo de fosfolipídeos da membrana plasmática na hemólise induzida pela toxina fosfolipase-D do veneno da aranha-marrom.....	91
C - Item 3: Atividade hemolítica das toxinas de animais peçonhentos: uma visão geral.....	93
D - Item 4: Mecanismo molecular da atividade hemolítica da fosfolipase-D presente no veneno de <i>Loxosceles intermedia</i>	94
D.1 Material e métodos	95
D.2 Resultados	109
E - Item 5: Nova isoforma de fosfolipase A ₂ de <i>Lonomia obliqua</i> : Clonagem, Expressão heteróloga e Caracterização funcional.....	132
E.1 Material e Métodos	133
E.2 Resultados	140
4. DISCUSSÃO	155
5. CONCLUSÃO	165
REFERÊNCIAS	167
ANEXOS	199

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As fosfolipases são uma família de enzimas capazes de hidrolisar ligações éster de fosfolipídeos e são encontradas em diversas fontes biológicas, incluindo os organismos procarióticos e eucarióticos. As fosfolipases compreendem dois tipos: as esterases alifáticas que compreendem as fosfolipases A₁ (PLA₁), fosfolipases A₂ (PLA₂) e fosfolipases B (PLB) e as fosfodiesterases que compreendem as fosfolipases C (PLC) e fosfolipases D (PLD). Elas promovem a hidrólise dos fosfolipídios com a liberação de produtos bioativos como por exemplo, ácidos graxos e diacilglicerol ou ácido fosfatídico, quando hidrolisam a fosfatidilcolina (Roberts, 1996) (Figura 1).

As PLA₁ e as PLA₂ catalisam a hidrólise nas posições sn-1 e sn-2, respectivamente, das ligações éster 1,2-diacil-3-sn-glicerofosfolipídios, convertendo esses substratos em seus compostos “Liso”, com a liberação de ácidos graxos como ácido araquidônico, que é um importante substrato para a produção de prostaglandinas e leucotrienos (Martins, Alves *et al.*, 2009). As PLB conseguem catalisar a hidrólise nas posições sn-1 e sn-2, simultaneamente (Kohler, Brenot *et al.*, 2006). As PLC por sua vez, são enzimas que fazem a clivagem de fosfolipídios imediatamente antes do grupo fosfato, enquanto as PLD promovem a clivagem de fosfolipídios imediatamente após o grupo fosfato, podendo gerar ceramida e ceramida-1-fosfato respectivamente, quando promovem a degradação da esfingomielina (Kohler, Brenot *et al.*, 2006).

Essas fosfolipases além de promoverem a liberação de mensageiros inflamatórios, também são capazes de romper vários tipos de membranas biológicas, levando à formação de poros e/ou lise celular (Monteiro, Romão *et al.*, 2009). Na figura 2 estão ilustrados alguns fosfolipídios presentes na membrana celular que podem ser hidrolisados por essas fosfolipases.

Em geral as células são definidas pela presença de uma barreira física promovida pela membrana, uma bicamada lipídica, a qual separa o interior das células do meio exterior. Porém, as células necessitam se comunicar entre si e com o ambiente e isso ocorre através de mensageiros extracelulares e intracelulares. Porém, os mensageiros químicos solúveis em água não podem atravessar as membranas celulares, assim que suas mensagens devem ser transmitidas através da membrana. Já os mensageiros lipossolúveis podem atravessar as membranas

celulares e se comunicam diretamente com o conteúdo da célula por ligação a receptores intracelulares. Dessa forma, as fosfolipases através da liberação desses mensageiros promovem a transdução de sinal, a qual possui papel fundamental em processos fisiológicos e patológicos (Eyster, 2007) .

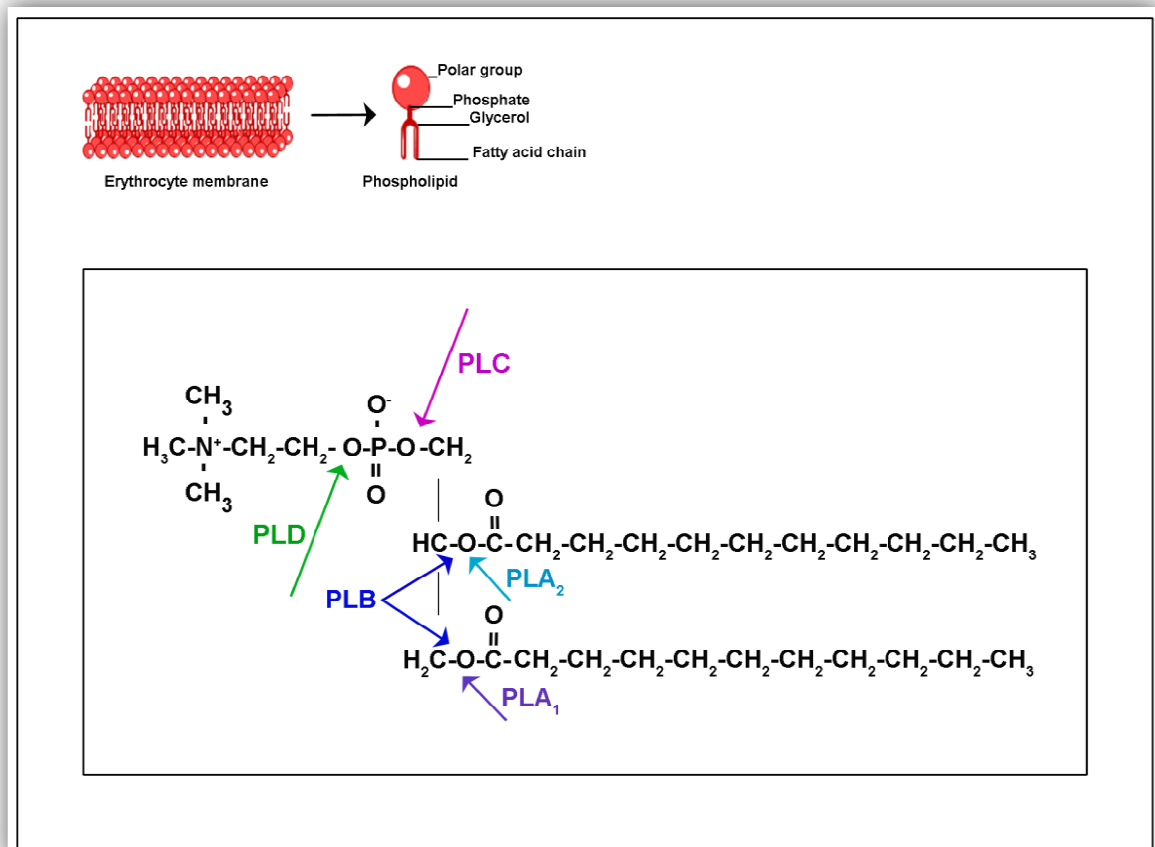


Figura 1: Locais de destino das clivagens promovidas pelas fosfolipases. Modificado a partir de Chaves-Moreira *et al.*, 2011b.

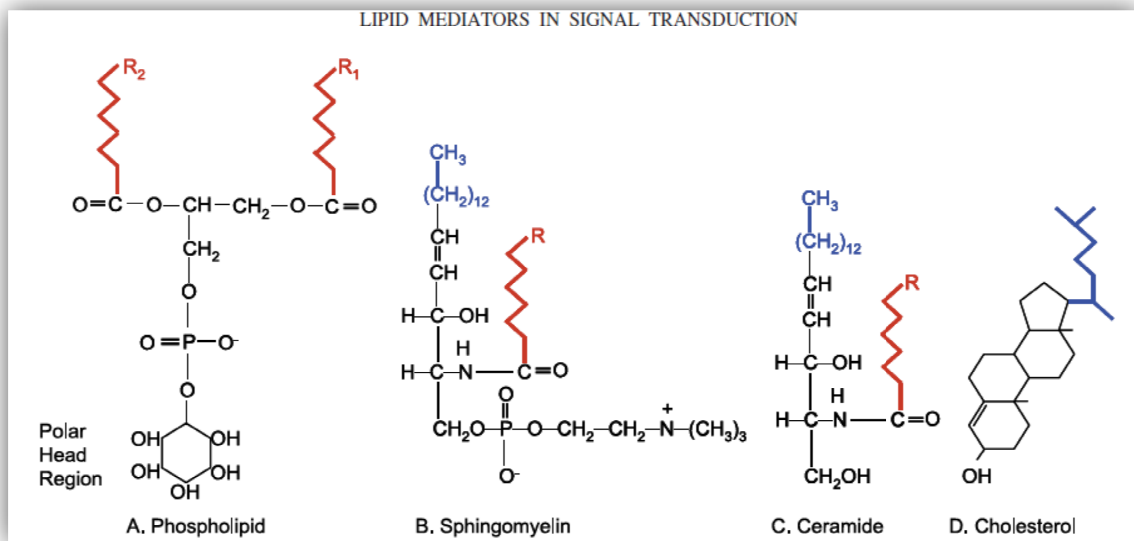


Figura 2: Estruturas de alguns lipídios presentes em membrana. (A) A estrutura de um fosfolípido (especificamente, fosfatidilinositol). (B) a estrutura da esfingomielina. (C) estrutura da ceramida. (D) A estrutura do colesterol. Os ácidos graxos nos lipídios são designados como "R" e são exibidos em vermelho. Cadeias de ácido graxo são mostrados em azul. As estruturas são orientadas com as regiões hidrofóbicas para o alto e com os grupos da cabeça polar para baixo. Modificado a partir de Eyster, 2007.

Alguns exemplos de vias de transdução de sinal por meio de metabolitos lipídicos estão ilustrados na figura 3. Em especial os gerados por meio da hidrólise da fosfatidilcolina e da esfingomielina pelas fosfolipases citadas anteriormente.

A presença de uma fosfolipase A₂ em contato com fosfatidilcolina dá origem ao ácido araquidônico (AA) importante agente pró-inflamatório. Enquanto a presença de uma fosfolipase D com esfingomielina dá origem à ceramida-1-fosfato (C1P) outro importante mediador de processos inflamatórios (Pettus, Chalfant *et al.*, 2004; Lamour e Chalfant, 2005; Hinkovska-Galcheva, Clark *et al.*, 2008; Hinkovska-Galcheva, Vanway *et al.*, 2008; Arana, Gangoiti *et al.*, 2010).

Algumas dessas fosfolipases são de origem animal, estando presente em venenos, e serão discutidas aqui devido à sua capacidade de induzir hemólise após contato acidental (Chaves-Moreira, Alvarenga *et al.*, 2011; Chaves-Moreira, Souza *et al.*, 2011).

A hemólise intravascular é um sintoma grave e pode aparecer em pacientes envenenados por abelhas e vespas (Daher Ede, Da Silva Junior *et al.*, 2003), aranhas (De Roodt, Salomon *et al.*, 2002), lagartas (Malaque, Andrade *et al.*, 2006), escorpiões (Valdez-Cruz, Davila *et al.*, 2004), anêmonas (Alvarez, Mancheno *et al.*, 2009) e serpentes (Gibly, Walter *et al.*, 1998). As fosfolipases presentes nos venenos desses animais peçonhentos (Figura 4), podem deflagrar uma variedade de efeitos farmacológicos e tóxicos que afetam os sistemas biológicos das vítimas (De Paula, Castro *et al.*, 2009). Apesar de algumas características comuns, tais como a estrutura primária conservada, as fosfolipases podem apresentar efeitos biológicos diferentes, tais como miotoxicidade, hemotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade, que contribuem para os sintomas do envenenamento (De Paula, Castro *et al.*, 2009).

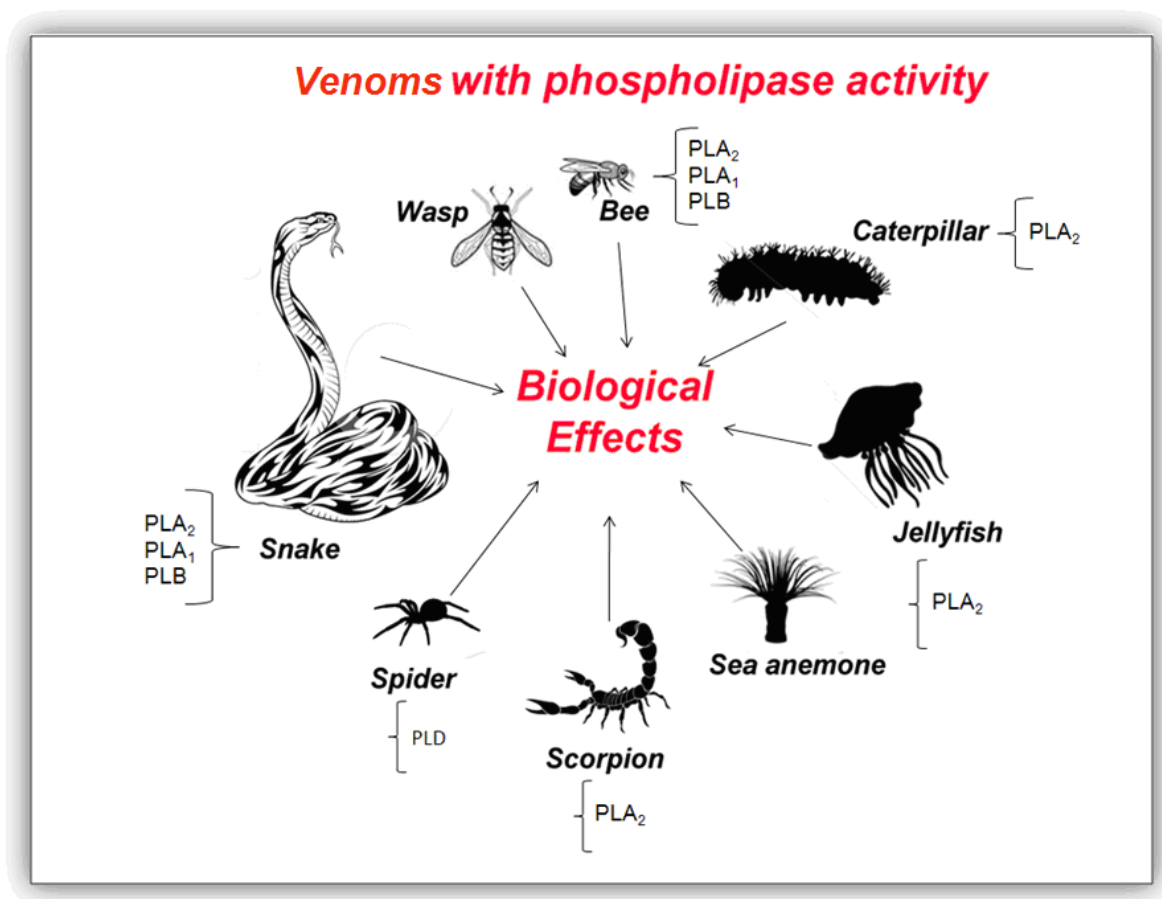


Figura 4: Ilustração de animais peçonhentos que apresentam atividade fosfolipásica em seus venenos. Podemos observar que as fosfolipases A₂ é a família mais encontrada. Modificada a partir de Sarikaya, 2011.

Devido à simplicidade de isolar essas enzimas, a sua estabilidade funcional, devido ao alto teor de pontes dissulfeto, seus efeitos enzimáticos, tóxicos e/ou farmacológicos, as fosfolipases têm atraído pesquisadores para analisar a sua relação estrutura/atividade. Nesta tese de doutorado foram elaboradas revisão dos aspectos diversos, estruturais e bioquímicos da fosfolipase-D presente no veneno da aranha *Loxosceles intermedia* e da fosfolipase A₂ presente veneno das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*, incluindo suas características biológicas e estruturais, a interação com seus receptores, os inibidores utilizados em estudos de relação estrutura-função, salientando igualmente o mecanismo de ação e o papel dos seus principais metabólitos, para caracterizar essas importantes enzimas envolvidas no processo de envenenamento por esses animais.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade biológica de algumas toxinas com atividade fosfolipásica presente em veneno de *L. intermedia* e *L. obliqua*. Para tanto, utilizou-se toxinas recombinantes, cujos clones foram obtidos a partir de biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia* e de biblioteca de cDNA das cerdas de *Lonomia obliqua*. Os dados desse estudo foram importantes para melhor compreensão do evento biológico observado nos acidentes com esses animais, além de propiciar novas informações sobre os possíveis mecanismos envolvidos na ação hemolítica desses venenos, que culminam na destruição prematura das células.

Aranha marrom:
“Loxosceles intermedia”




1.1 Aranhas do gênero *Loxosceles*

As aranhas são animais peçonhentos comuns, encontrados em grande número em quase todos os ambientes, em regiões de clima equatorial e temperado, incluindo meio urbano (Isbister e Gray, 2002; White, Warrell *et al.*, 2003). Praticamente todas as espécies são venenosas, mas muitas não são capazes de picar os seres humanos de forma eficaz por serem bastante pequenas. Outras estão raramente envolvidas em acidentes com seres humanos, uma vez que a probabilidade de encontro entre as espécies é baixa. A maioria das espécies restantes causam apenas efeitos clínicos mínimos (Isbister e Gray, 2002; White, Warrell *et al.*, 2003). A morbidade clinicamente significativa decorrente da picada de aranhas é relativamente restrita a um número pequeno de espécies e mesmo assim o índice de óbitos é bastante baixo (White, Warrell *et al.*, 2003; White, 2010; 2011). Porém, alguns gêneros de aranha causam morbidade e mortalidade significativas e, portanto, podem ser considerados problemas de saúde pública; as aranhas do gênero *Loxosceles* são um exemplo disso (Chaim, Trevisan-Silva *et al.*, 2011).

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família *Sicariidae*, composta por dois gêneros e 124 espécies (Platinick, 2011). Receberam o nome popular de aranha-marrom por apresentarem coloração que varia do marrom claro ao escuro (Figura 1). Podem ser encontradas em regiões de diferentes latitudes, e são adaptadas a distintas condições ambientais das zonas de clima tropical e temperado do globo terrestre (Tavares, Peichoto *et al.*, 2011). Representantes deste gênero estão espalhadas pelos cinco continentes e há relatos de acidentes com seres humanos em diferentes regiões do planeta envolvendo estas aranhas, como por exemplo, no leste Europeu (Pernet, Dandurand *et al.*, 2010), no Oriente Médio (Taskesen, Akdeniz *et al.*, 2011), na África (Duncan, Rynerson *et al.*, 2010), na Oceania (Vetter e Isbister, 2008), nas Américas do Norte (Saupe, Papes *et al.*, 2011) e do Sul (Bucarety, De Capitani *et al.*, 2010).

No continente americano provavelmente se encontra a maior diversidade de espécies, sendo relatadas mais de 50 apenas na América do Norte e mais de 30 espécies na América do Sul (Platinick, 2011). Em algumas regiões do Brasil, Chile e Peru os acidentes provocados por aranhas do gênero *Loxosceles* constituem um significativo problema de saúde pública (Da Silva, Da Silveira *et al.*, 2004; Hogan,

Barbaro *et al.*, 2004; Peterson, 2006; De Souza, Malaque *et al.*, 2008). Sabe-se atualmente da existência de 11 espécies de aranha-marrom registradas no Brasil (Tabela 1) (Platinick, 2011), sendo que quatro ocorrem no estado do Paraná: *L. intermedia*; *L. gaucho*; *L. laeta* e *L. hirsuta* (Marques-Da-Silva e Fischer, 2005; Fischer, 2008; Fischer, Bazilio *et al.*, 2009). Na figura 5 pode-se visualizar a distribuição geográfica de todas as espécies de aranhas marrons encontradas no Brasil.

Espécie	Característica	Dados adicionais
<i>L. adelaida</i>	Espécie do grupo da <i>Loxosceles gaucho</i>	<i>L. a.</i> Brignoli, 1972.
<i>L. amazonica</i>		<i>L. a.</i> Duncan et al., 2010.
<i>L. anomala</i>	Posição filogenética do grupo é incerta	<i>L. a.</i> Álvares, Rodrigues & De Maria, 2004.
<i>L. chapadensis</i>		<i>L. c.</i> Bertani, Fukushima & Nagahama, 2010.
<i>L. gaucho</i>		<i>L. g.</i> Duncan et al., 2010.





<i>L. hirsuta</i>		<i>L. h.</i> Gertsch, 1967.
<i>L. immodesta</i>	Posição filogenética do grupo é incerta	<i>Calheirosia i.</i> Mello-Leitão, 1917.
<i>L. intermedia</i>		<i>L. i.</i> Fischer, 1994.
<i>L. laeta</i>		<i>L. l.</i> Fischer, 1994.
<i>L. puortoi</i>		<i>L. p.</i> Martins, Knysak & Bertani, 2002.
<i>L. similis</i>	Espécie do grupo da <i>Loxosceles gaucho</i>	<i>L. s.</i> Bücherl, 1972.

Tabela 1: Aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles* (Heineken & Lowe, 1832), presentes no Brasil. Modificado a partir de Cramer, 2009; Duncan, Rynerson *et al.*, 2010; Platnick, 2011.

Figura 5: Distribuição geográfica das espécies de aranhas-marrons, encontradas no Brasil.

Essas aranhas não são agressivas, possuem hábitos noturnos, são bastante sedentárias, sendo que a maioria dos acidentes ocorre quando as pessoas comprimem a aranha ao vestir-se, enxugar-se ou durante o sono, ocorrendo a picada no homem apenas como forma de defesa (Futrell, 1992). Elas podem ser encontradas em lugares escuros como, por exemplo, em telhas empilhadas, em entulhos e em restos de vegetais. Já no ambiente intra-domiciliar, essas aranhas podem ser encontradas atrás de quadros, de móveis e entre as roupas. Costumam se adaptar a lugares sombrios e com pouca higiene. Apresentam teias irregulares, parecendo algodão esfiapado e pegajoso (Figura 6). Toleram temperaturas variando de 8 a 43° C e sobrevivem sem alimento por períodos prolongados de tempo (Futrell, 1992; Da Silva, Da Silveira *et al.*, 2004). A aranha-marrom alimenta-se de pequenos insetos e serve de alimento para anfíbios, répteis e aves. Ao atingirem um ano de vida, adquirem maturidade sexual (Fischer, 2008).



Figura 6: Aspecto das aranhas do gênero *Loxosceles*. Observa-se o cefalotórax, um sinal mais escuro em forma de violino, que lhe confere o nome popular. Teia em forma de algodão, desordenada e irregular. Modificada a partir de Cabrerizo, Docampo *et al.*, 2009.

Outra característica importante do gênero *Loxosceles* é relativa ao número de olhos: seis divididos em 3 pares em forma de semi-círculo sobre o cefalotórax, que é baixo, não ultrapassa a linha do abdômen e apresenta o desenho de um violino (Figura 7) (Peterson, 2006).

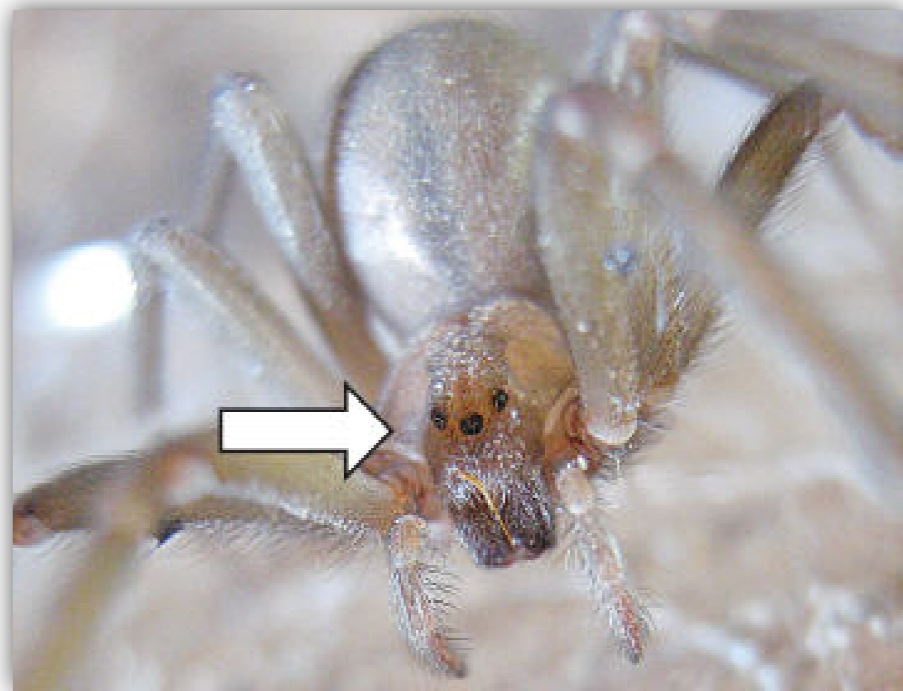


Figura 7: Aranha-marrom gênero *Loxosceles* sp. Em detalhe a disposição dos 3 pares de olhos e a forma de um violino sobre o cefalotórax (seta larga branca). Modificada a partir de Cabrerizo, Docampo *et al.*, 2009.

No continente americano o gênero *Loxosceles* é dividido em cinco grupos de radiação evolutiva: *reclusa*, *laeta*, *gaucho*, *spadicea* e *amazônica* (Fischer, 2007). Gertsch e colaboradores (1967) revisaram as espécies de *Loxosceles* encontradas no Brasil, dividindo-as em grupos nominais com base nas características morfológicas da genitália, coloração, e proporções corporais. Todas as espécies encontradas no Brasil pertencem aos grupos *gaucho*, *laeta*, *spadicea* e *amazônica*. A genitália maculina é constituída pelos palpos e a genitália feminina é constituída pela espermateca (Álvares, Rodrigues *et al.*, 2004). Os machos podem ser facilmente distinguidos pela constrição mediana no pedipalpo, dando-lhe uma forma semelhante ao número oito em vista retrolateral, e pela presença de uma projeção paralela bem desenvolvida na base de êmbolo (Figura 8). As fêmeas são distinguidas pelas espermatecas ovais grandes e afastadas 2-3 vezes o diâmetro entre si (Figura 8).

A aranha-marrom *Loxosceles intermedia* é a espécie predominante no município de Curitiba, estado do Paraná (Fischer, 2008). Suas características específicas são: tamanho médio de 16 mm, poucos pêlos no corpo, coloração marrom-avermelhada, disposição característica dos pêlos na região do cefalotórax, presença de sulcos laterais menos curvos e presença de dois receptáculos seminais nas fêmeas (espermateca) (Mello-Leitão, 1917). As fêmeas apresentam epigynum globoso e os machos apresentam bulbo copulatório exclusivo e pequeno com uma sutil curvatura para fora (Figura 8) (Álvares, Rodrigues *et al.*, 2004).

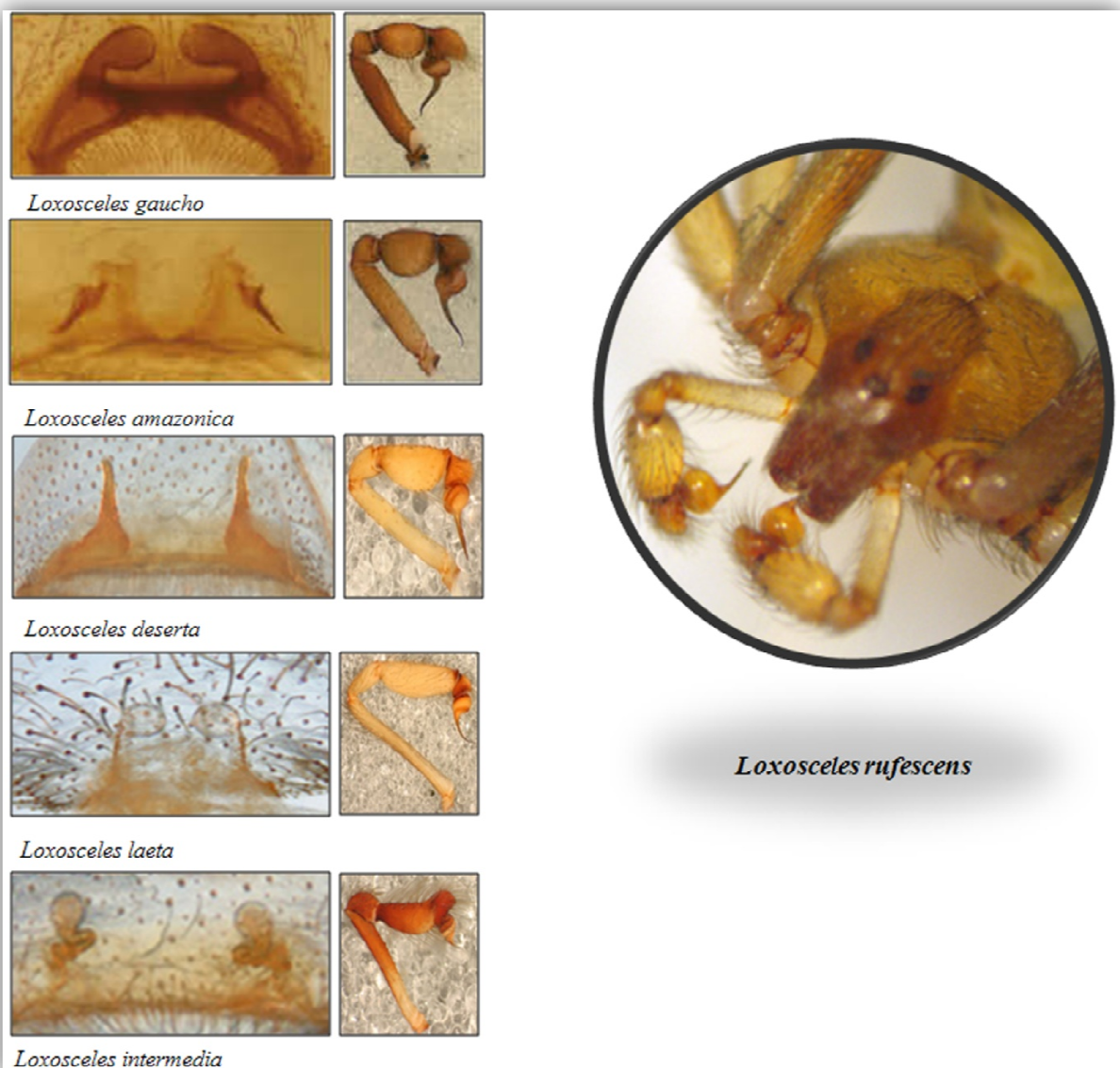


Figura 8: Imagem das genitálias das espécies de *Loxosceles*. Em detalhe os pedipaldos da *Loxosceles rufescens*. Na coluna da esquerda podemos observar a genitália feminina de algumas espécies de aranha marrom (Epigynum). Ao lado podemos visualizar a genitália masculina característica de cada espécie de aranha marrom (Pedipalpo). Escala de 1000 μ m. Modificado a partir de Cramer, 2009.

A aranha-marrom apresenta dimorfismo sexual, sendo normalmente as fêmeas maiores que os machos (Figura 9). Estes apresentam palpos com os tarsos modificados, “os pedipalpos”, especializados na transferência de espermatozóides (Fischer, 2007). A *L. intermedia* se reproduz, preferencialmente, nos meses mais quentes do ano, podendo depositar, em média, 20 ovos por postura (Fischer e Vasconcellos-Neto, 2005; Fischer, 2007), dos quais eclodem as aranhas jovens em 46 dias (Fischer e Vasconcellos-Neto, 2005). A aranha fêmea constrói uma teia complexa, a ooteca, em formato de saco, onde os ovos são acondicionados no momento da postura. Após a eclosão, as pré-larvas sofrem duas mudas antes de deixar a ooteca em busca de alimento (Fischer e Vasconcellos-Neto, 2005). Cada fêmea de *Loxosceles* pode produzir até quinze ootecas, figura 10, durante sua vida e cada uma destas pode conter até 138 ovos (Gonçalves De Andrade, De Oliveira *et al.*, 1999).

O comportamento sexual da espécie *Loxosceles laeta* foi caracterizado por Fisher (2007; 2008), e foi descrita uma intensa utilização da teia e exibição de padrões motores relacionados com a sua maior agressividade quando comparada com outras espécies do gênero. (Fischer e Vasconcellos-Neto) e (Marques-Da-Silva e Fischer) em 2005 demonstraram também em seus estudos que a ampla distribuição da espécie *Loxosceles intermedia* está relacionada com seu hábito mais generalista, mais errante e menos agressivo do que a *Loxosceles laeta*. Além disso, os padrões motores exibidos no reconhecimento e cortejo da *Loxosceles laeta* foram semelhantes com os das aranhas do grupo gaúcho, *Loxosceles gaúcho* (Rinaldi e Stropa, 1998) no que diz respeito à intensa utilização da teia com golpes e tremulação das pernas, enquanto que as espécies do grupo spadicea, *Loxosceles hirsuta*, *Loxosceles intermedia* e do grupo reclusa, *Loxosceles reclusa* são mais características pela pulsação abdominal e vibração dos pedipalpos, padrões motores envolvidos na produção de sons, não sendo a ausência de teia limitante para realização da cópula (Rinaldi e Stropa, 1998; Fischer, 2007).

Segundo Marchioro, Fischer e Marques da Silva (2004) existe influência da alimentação monoespecífica no desenvolvimento pós-embrionário de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaúcho*. De acordo com estes autores, filhotes dessas espécies de aranha, que foram alimentados com ninfas de *Pycnoscelus surinamensis* apresentam desenvolvimento mais rápido e maior número de ecdise, do que os alimentados com larvas de *Tenebrio molitor*.

A *L. intermedia* é por tanto, um animal rústico, que sobrevive bem à escassez de alimentos e grandes variações de temperatura. O aumento da sua população, observada em Curitiba e região metropolitana, é atribuído ao grande crescimento das cidades, com conseqüente destruição do seu *habitat* e desaparecimento de seus predadores naturais. Como resultado, desse desequilíbrio ambiental essas aranhas encontraram no ambiente domiciliar um excelente local para sua sobrevivência e reprodução, com conseqüente aumento dos casos de loxoscelismo no município de Curitiba e arredores, sendo hoje considerado um problema de saúde pública (Marques Da Silva e Fischer, 2000).

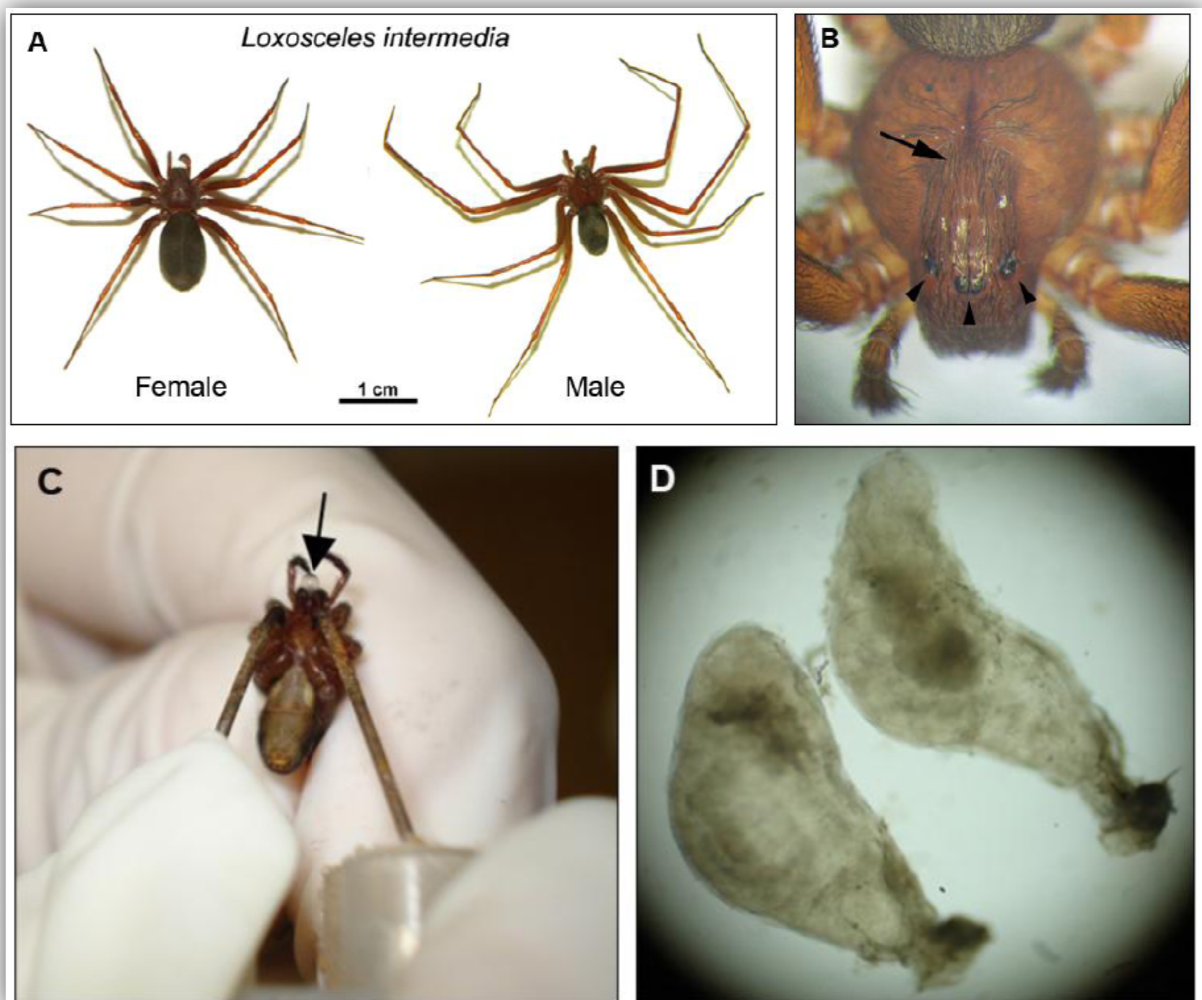


Figura 9: Detalhes anatômicos da espécie *Loxosceles intermedia*. (A) Animais adultos de *Loxosceles intermedia*: fêmea e macho. (B) Padrão em forma de violino (seta) sobre a superfície dorsal do cefalotórax da aranha adulta *Loxosceles intermedia*, e os seis olhos organizados em pares e em semicírculo (cabeça de seta). (C) Coleta do veneno por eletro choque aplicado sobre o cefalotórax, seta indica a gota de veneno de *Loxosceles intermedia*. O veneno é extraído através de um choque elétrico de 15 V, aplicado sobre o cefalotórax da aranha o veneno

é então coletado e diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) armazenada a -80°C até o uso. (D) Par de glândulas produtoras de veneno da *Loxosceles intermedia*, observadas em microscópio de dissecação (40x). A extração pode ser realizada diretamente das glândulas de veneno, através da compressão suave das mesmas. Modificado a partir de Chaim, Trevisan-Silva *et al.*, 2011.



Figura 10: Ooteca e ovos de *Loxosceles intermedia*. (A) Na seta podemos visualizar uma Ooteca. (B) Em detalhes os Ovos. Cortesia de Mônica Akemi Alcântara.

1.2 Epidemiologia

Furlanetto (1961) abordou o problema do acidente loxoscélico no Brasil apresentando os primeiros casos publicados suspeitos de terem sido causados por *Loxosceles* em 1915. O primeiro caso confirmado de loxoscelismo no Brasil foi diagnosticado no Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan, São Paulo, em 1954, descrito posteriormente por Cardoso e de Cillo (1990).

Na cidade de Curitiba, Ribeiro e colaboradores (1993) analisaram 923 acidentes loxoscélicos ocorridos entre 1989 e 1990. Corresponderam a 52,7% dos acidentes por aracnídeos notificados no Estado do Paraná, sendo utilizada a soroterapia em 46,6%. No gráfico 1 podemos visualizar a série histórica dos acidentes com aranha marrom *Loxosceles sp.* no estado do Paraná. Além disso, esse tipo de acidente representou o quinto agravo em notificação entre as cinco principais ocorrências, no Paraná em 1997. Em 2001 os acidentes loxoscélicos atingiram o segundo lugar entre as ocorrências, sendo menor apenas que o atendimento antirrábico humano. Essa segunda posição tem sido mantida até hoje (SESA/DEVA/DVVZI/SINAN, 2011). Ainda assim, no ano corrente, o município de Curitiba apresentou 76% do total de casos de loxoscelismo do Estado. Da mesma

forma, registrou-se alta incidência desse tipo de acidente quando se analisou a 2ª Regional de Saúde, que compreende Curitiba e a Região Metropolitana. Mostrou-se também, que nove dos dez primeiros municípios em frequência de acidentes (92,9% do total) pertencem a essa regional de saúde (Gráfico 1).

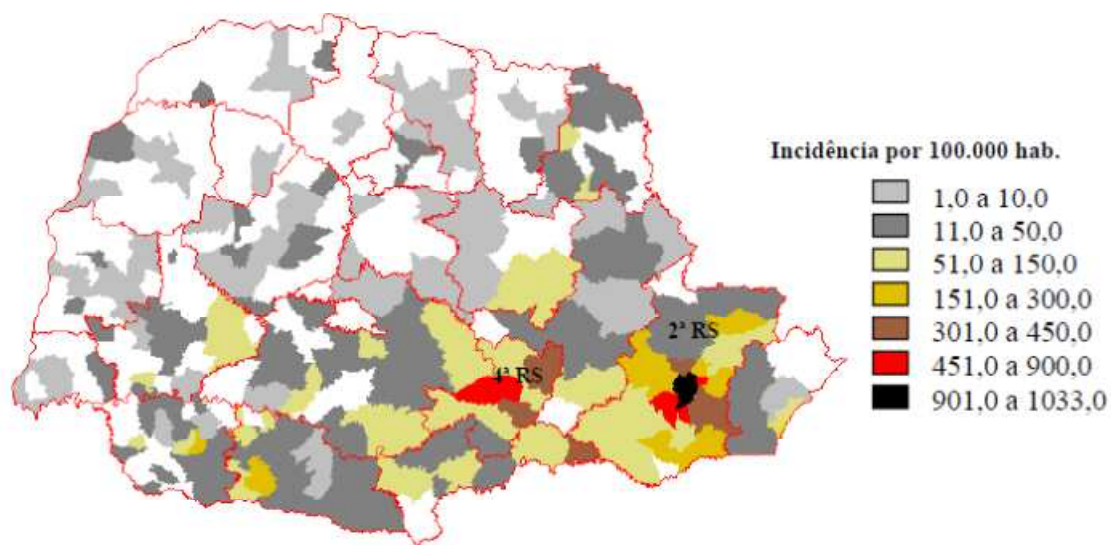


Gráfico 1: Mapa da distribuição dos acidentes loxoscélicos por coeficiente de incidência média nos municípios do Estado do Paraná, registrados de 1993 a 2000. Modificado a partir de Marque Da Silva, 2002.

No Gráfico 2, pode-se observar a série histórica dos acidentes com aranha-marrom na cidade de Curitiba. Recentemente, segundo o Boletim Epidemiológico de Curitiba ocorreram quase 500 notificações de acidentes com aranha-marrom na capital do estado apenas nos primeiros três meses de 2011 (Gráfico 2). Dados preliminares indicaram também quase 2000 mil acidentes com essa aranha no ano passado. Além disso, segundo a senhora Edla Marília Rigoni, responsável pelo acompanhamento epidemiológico de acidentes por animais peçonhentos no Paraná, em todo o estado ocorreram 5682 casos de loxoscelismo em 2009, sendo que aproximadamente 72% desse total de casos, ocorreu em Curitiba e Região Metropolitana (Gráfico 3) e desse montante 14 casos foram considerados muito graves. Esses dados comprovam que essa região abrange os municípios com maior incidência de loxoscelismo do Estado. Esses dados justificam a necessidade do

estudo da biologia da aranha marrom, das toxinas do seu veneno, assim como dos seus efeitos biológicos, uma vez que essas informações poderão futuramente contribuir de alguma forma para a prevenção de acidentes.

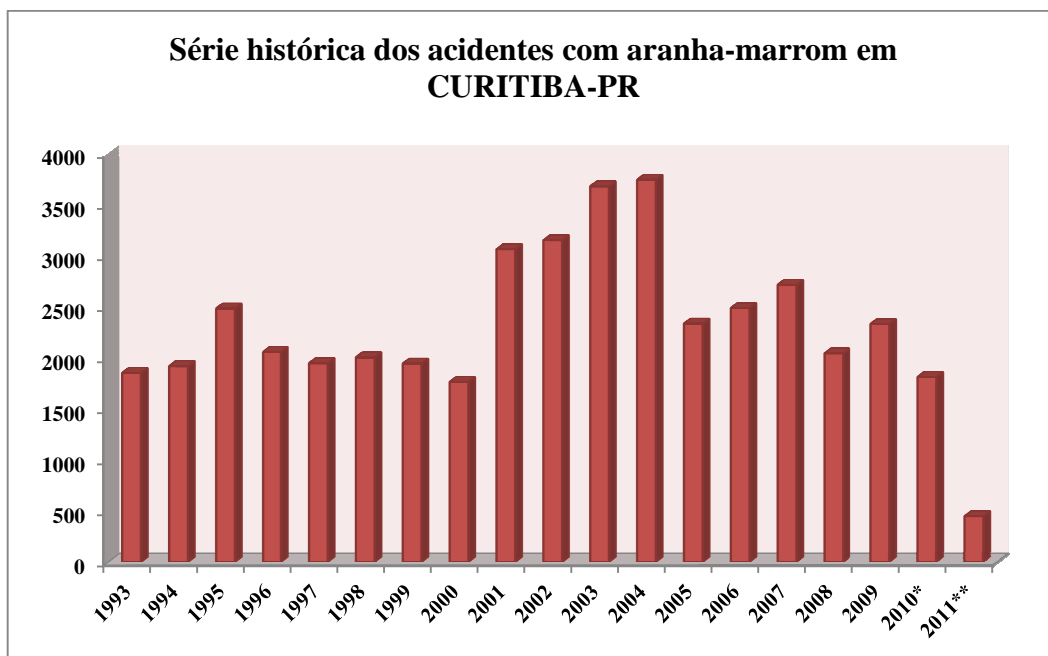


Gráfico 2: Série histórica dos acidentes com aranha-marrom “*Loxosceles sp.*”. Dados preliminares até 08/04/2011. Com a permissão de Marcelo Luiz Vettorello. Fonte: SMS/CE/CVE.

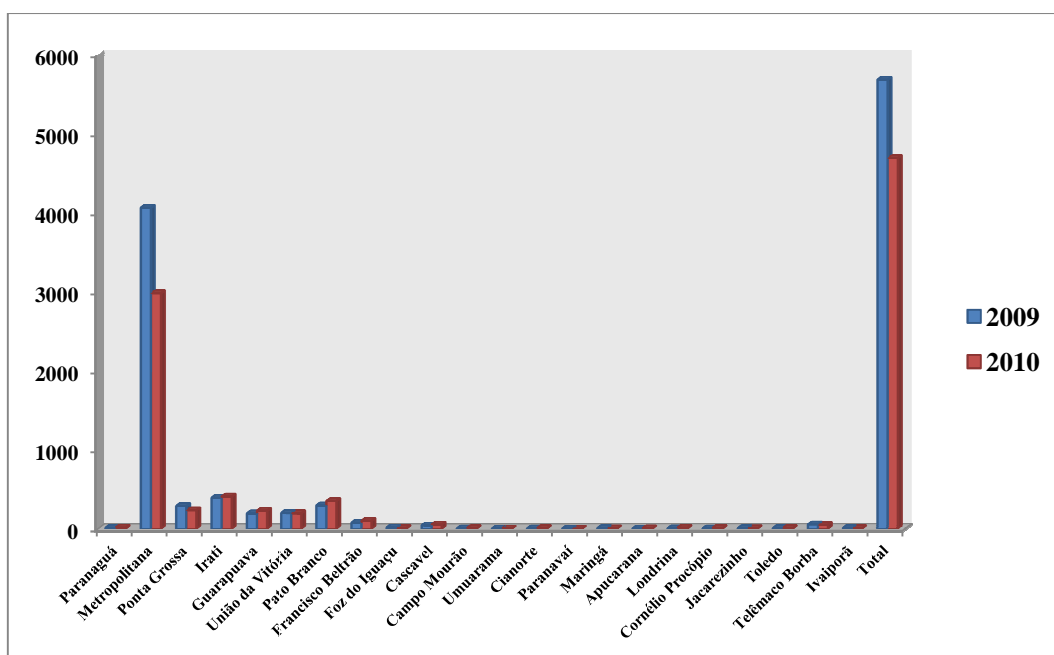


Gráfico 3: Número de acidentes com aranha-marrom “*Loxosceles sp.*” por Regional de Saúde entre os anos de 2009 e 2010. Dados atualizados em 06/04/2011. Com a permissão de Edla Marília Rigoni. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI-SINAN.

Cerca de 80% dos acidentes envolvendo a aranha-marrom ocorrem quando as pessoas se vestem. Os membros inferiores (coxa, perna, pé e dedos dos pés) são preferencialmente atingidos (Gráfico 4). As mulheres acabam sendo as maiores vítimas, cerca de 60%, por passarem mais tempo em casa (Gráfico 5). A faixa etária mais atingida é de adultos de 20 à 49 anos (Gráfico 6). Segundo o biólogo da Secretaria Municipal de Saúde, Marcelo Luiz Vettorello, Curitiba e região metropolitana concentram os acidentes com essa aranha (SMS/CE/CVE, 2011).

Os acidentes podem ser divididos de acordo com a intensidade dos sintomas. Os casos leves não apresentam comprometimento do estado geral nem lesão característica 72 horas após a picada. Os casos moderados possuem lesão característica e alterações sistêmicas, mas sem evidência de hemólise. Os casos graves apresentam o quadro moderado mais agravado, associado à anemia aguda e presença de hemólise. Alguns bairros de Curitiba concentram um maior número de acidentes graves, como São Braz e Sítio Cercado (Gráfico 7).

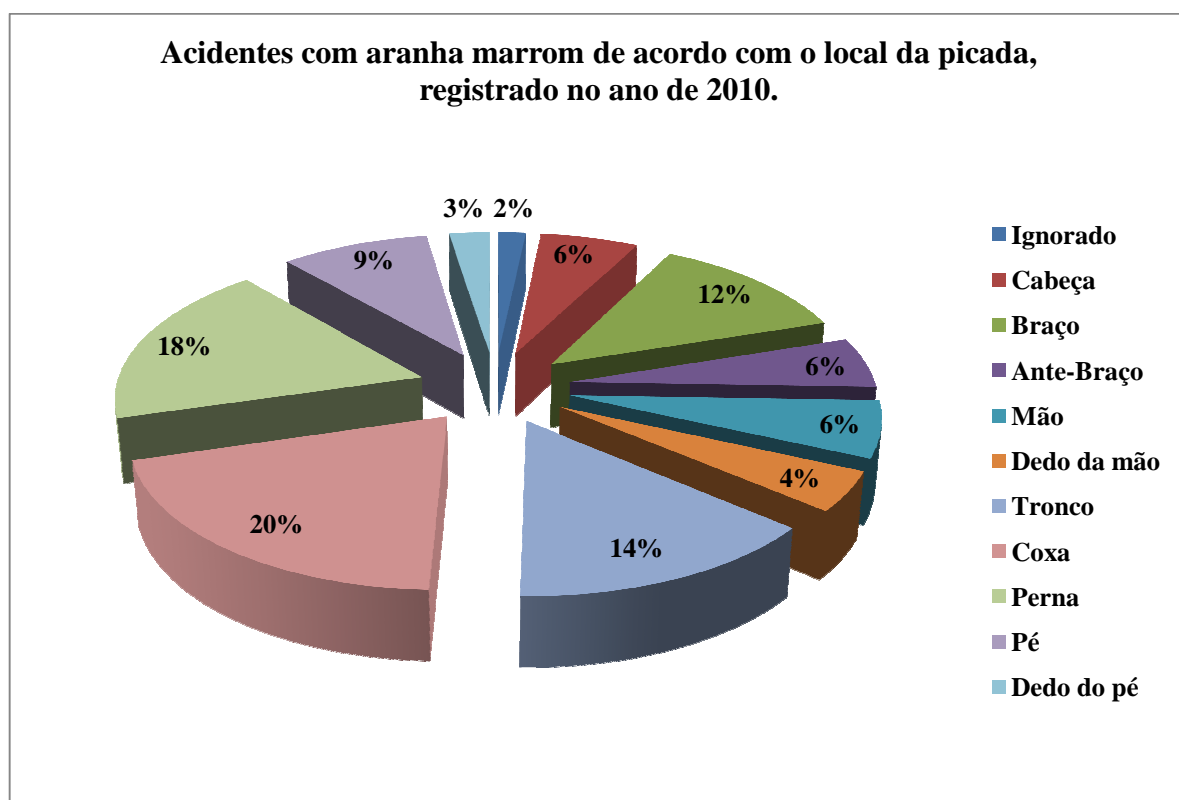


Gráfico 4: Número de acidentes com aranha-marrom “*Loxosceles sp.*” de acordo com o local da picada, registrado no ano de 2010. Dados atualizados em 06/04/2011. Com a permissão de Edla Marília Rigoni. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI-SINAN.

Acidente com aranha-marrom de acordo com o sexo registrado no ano de 2010

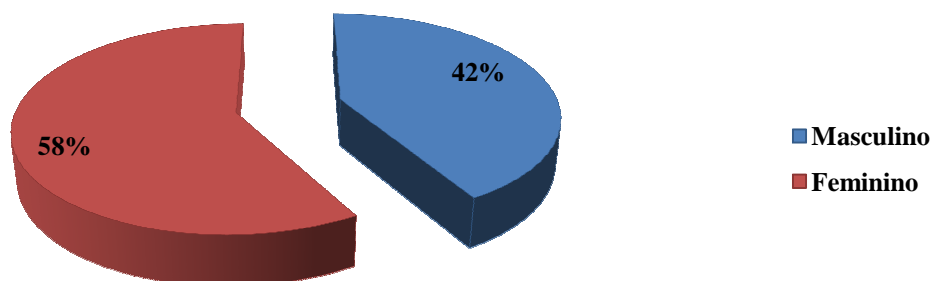


Gráfico 5: Número de acidentes com aranha-marrom “*Loxosceles sp.*” de acordo com o sexo da vítima, registrados no ano de 2010. Dados atualizados em 06/04/2011. Com a permissão de Edla Marília Rigoni. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI-SINAN.

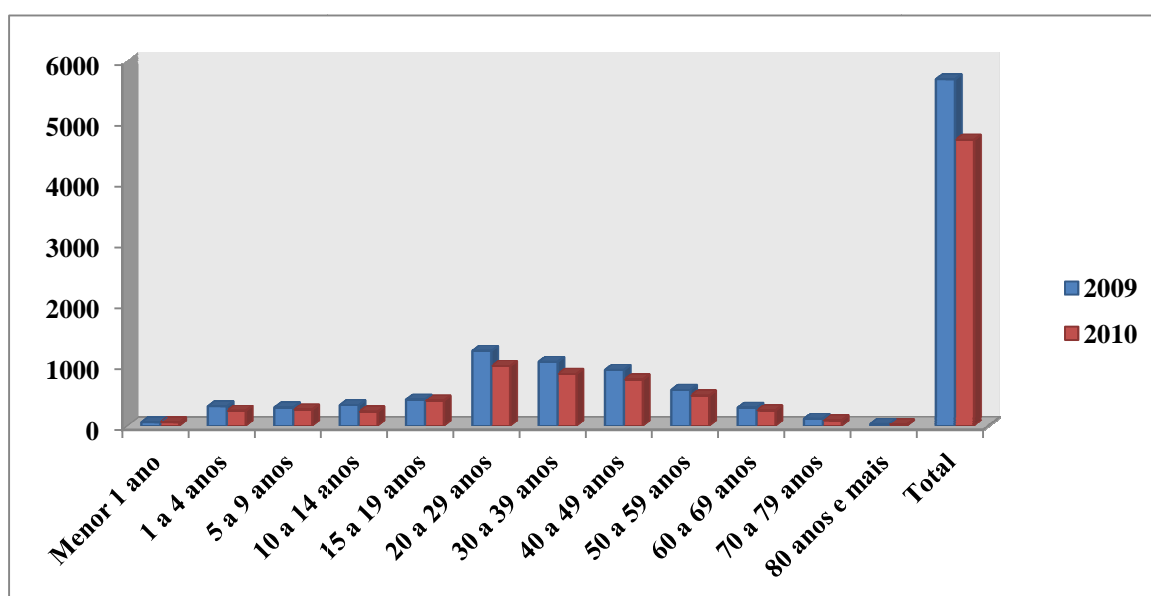


Gráfico 6: Número de acidente com aranha-marrom “*Loxosceles sp.*” de acordo com a faixa etária da vítima entre os anos de 2009 e 2010. Dados atualizados em 06/04/2011. Com a permissão de Edla Marília Rigoni. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI-SINAN.

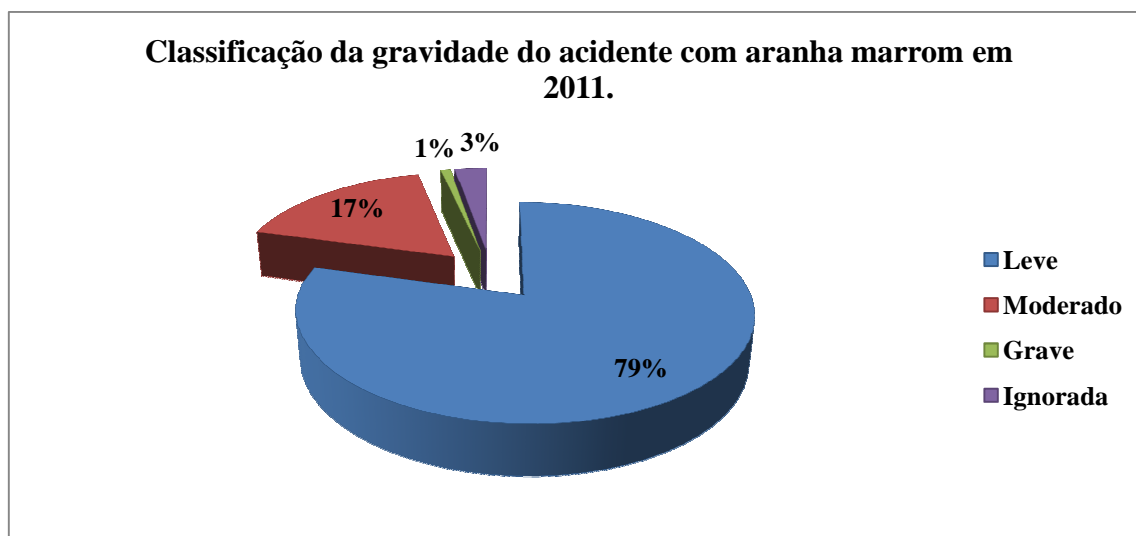


Gráfico 7: Número de acidentes com aranha-marrom de acordo com a gravidade do quadro desenvolvido após a picada. Dados preliminares até 08/04/2011. Com a permissão de Marcelo Luiz Vettorello. Fonte: SMS/CE/CVE.

1.3 Acidente loxoscélico

Como já anteriormente definido, o acidente loxoscélico ou loxoscelismo é a designação do quadro clínico desenvolvido por indivíduos picados por aranhas do gênero *Loxosceles* (Futrell, 1992). Esse quadro clínico provocado pelo envenenamento pode se manifestar de duas formas. Primeiro como quadro cutâneo ou dermonecrótico (84-97% dos casos) e, segundo, como quadro cutâneo-visceral ou sistêmico (3-16% dos casos) (Barbaro, Cardoso *et al.*, 1992). Os efeitos sistêmicos do envenenamento são potencialmente fatais devendo ser clinicamente abordados de forma rápida e objetiva (Peterson, 2006). A gravidade do acidente e o desenvolvimento de determinado quadro clínico dependerá de fatores relacionados com a espécie de aranha-marrom (Ministério da Saúde, 2001), seu sexo, o estágio de desenvolvimento (Gonçalves De Andrade, De Oliveira *et al.*, 1999) e a quantidade de veneno inoculado (Sezerino, Zannin *et al.*, 1998). Além disso, dependerá das características genéticas do indivíduo acidentado (Barreto, Cardoso *et al.*, 1985), como o estado nutricional da vítima, local da picada, susceptibilidade ao veneno e o tempo que o acidentado leva para obter tratamento correto (Barbaro, Eickstedt *et al.*, 1994). Apenas uma picada pode ser suficiente para desencadear um quadro de envenenamento letal.

Os principais sinais clínicos apresentados na evolução do quadro clínico do loxoscelismo estão apresentados na Tabela 2. O quadro cutâneo é caracterizado por dermonecrose na região da picada (Rees, Nanney *et al.*, 1984). Esta lesão, por ser de início pouco dolorido, não é percebida pelo indivíduo. Após 2 a 8 horas, surge a dor, que pode variar de moderada a severa, e é caracterizada por ser local e do tipo “queimação” ou ardência. Ocorrem também, prurido, edema, mal-estar geral e febre. Em seguida, pode surgir uma lesão circulada por halo vermelho, com uma zona pálida central, chamada de placa marmórea (Futrell, 1992). Após 3 a 5 dias do acidente, pode ocorrer acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, necrose e formação de abscesso (Futrell, 1992). Em certos casos, a lesão cutânea necrótica evolui em 2 a 6 semanas para formação de uma escara de difícil cicatrização, podendo originar sequelas deformantes.

A lesão pode ser agravada por uma infecção secundária, causada por microrganismos oriundos das quelíceras da aranha, que no momento da picada podem ser inoculados juntamente com o veneno. Um microrganismo presente nas quelíceras da aranha marrom é o *Clostridium perfringens*, bacilo gram positivo anaeróbico, considerado um importante agente de infecção secundária à picada pela aranha-marrom (Monteiro, Rubel *et al.*, 2002).

TEMPO[#]	QUADRO LOCAL[#]	QUADRO SISTÊMICO[#]	COMPLICAÇÃO[#]
0 – 3 dias*	Dor, edema endurecido, eritema, vesículas, bolhas, equimose e palidez (placa marmórea)	Exantema, prurido, febre, náusea, vômito, mialgia, calafrios, fraqueza, mal-estar, icterícia e anemia (decorrentes da hemólise)	CIVD** IRA***
3-7 dias	Formação e evolução da necrose e regressão do edema e eritema		
7-120 dias	Gradual regressão da lesão e úlcera		

Tabela 2: Evolução do quadro clínico em função do tempo após o acidente loxoscélico. (Ministério da Saúde, 2001; Barbaro e Cardoso, 2003).

* Os sinais locais se acentuam nas primeiras 24 a 72 horas.

**CIVD, Coagulação intravascular disseminada.

*** IRA, insuficiência renal aguda.

Existe grande variabilidade individual de cada paciente em relação ao tempo de evolução do quadro clínico lesão bem como na presença ou não dos sinais cutâneos, sistêmicos e sintomas.

Algumas vítimas podem desenvolver a forma mais grave de loxoscelismo, que corresponde ao quadro cutâneo-visceral ou sistêmico. Os sintomas desse quadro são astenia, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléias, obnubilação, convulsões e coma. Pode haver também “*rash*” cutâneo. A forma sistêmica pode ser acompanhada pela lesão dermonecrotica (Futrell, 1992; Bravo, Puratic *et al.*, 1993). Nos casos mais graves ocorre anemia hemolítica, trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária (Futrell, 1992; Da Silva, Da Silveira *et al.*, 2004) e coagulação intravascular disseminada “CIVD” (Denny, Dillaha *et al.*, 1964). Esses eventos podem determinar diminuição do hematócrito, aumento da bilirrubina indireta, icterícia, petéquias, equimoses e hemoglobinúria, sinais clínicos que geralmente se instalam nas primeiras 24 horas após o acidente (Futrell, 1992; Peterson, 2006). Não obstante, pode ocorrer também insuficiência renal aguda (IRA) de etiologia multifatorial, associada com a diminuição da perfusão renal, alterações vasculares nos pulmões e fígado (Lung e Mallory, 2000). A insuficiência renal aguda (IRA), associada à obstrução da luz tubular é a principal causa de morte nos acidentes loxoscélicos (Saúde, 2001).

Os mecanismos moleculares que levam à IRA são desconhecidos. Entretanto, sabe-se que o veneno da glândula da *Loxosceles intermedia* tem atividade entactinolítica e degrada o domínio protéico do heparan-sulfato proteoglicano, considerado um importante constituinte molecular encontrado nas membranas basais, estruturas fundamentais dos glomérulos renais, envolvidos na formação da urina (Veiga, Gremski *et al.*, 1999; Luciano, Da Silva *et al.*, 2004). Neste contexto, estudos realizados “*in vivo*” e “*in vitro*” utilizando camundongos e a linhagem celular MDCK (células epiteliais de rim canino), mostraram que as toxinas do veneno de *L. intermedia* apresentam atividade nefrotóxica direta sobre o tecido renal (Chaim, Sade *et al.*, 2006). Logo em seguida, Kusma e colaboradores (Kusma, Chaim *et al.*, 2008) demonstraram que a isoforma recombinante de fosfolipase-D, LiRecDT1 foi capaz de desencadear efeito nefrotóxico direto, tal como o veneno bruto da glândula, sugerindo que essa nefrotoxicidade é dependente da atividade fosfolipásica da toxina.

Recentemente, tornou-se público um caso nacional de loxoscelismo sistêmico (De Souza, Malaque *et al.*, 2008), no qual foram observados os distúrbios críticos decorrentes do envenenamento por aranha-marrom. A vítima apresentou hemólise intravascular, rabdomiólise, coagulopatia e insuficiência renal aguda, além

do desenvolvimento de uma lesão dermonecrotica, com espalhamento gravitacional no local da picada, como ilustrado na Figura 11.

Nesses casos existe a indicação de administração do soro anti-veneno (Pauli, Puka *et al.*, 2006; Pauli, Minozzo *et al.*, 2009). Dados experimentais revelam que a eficácia da soroterapia é reduzida após 36h da inoculação do veneno. As recomendações para utilização do soro anti-veneno dependem da gravidade das manifestações clínicas, como é ilustrado na Tabela 3. Além da soroterapia, tem sido recomendado o uso de corticosteróide local (como antiinflamatório) e por via sistêmica (para proteger a membrana do eritrócito). Também é utilizado a dapsona nas formas cutâneas graves, em associação com a soroterapia, como modulador da resposta inflamatória para redução do quadro local. A dose de dapsona utilizada se encontra no intervalo de 50 a 100 mg/dia, sendo administrada por via oral durante um período máximo de duas semanas. A dapsona pode desencadear metemoglobinemia, que deve ser monitorada laboratorialmente. Além disso, se existirem evidências de hemólise intravascular, impõe-se hidratação adequada e alcalinização da urina, para prevenir a precipitação intra-tubular de hemoglobina. Isso seria um possível fator para desencadear necrose tubular aguda hemoglobinúrica (Cardoso, França *et al.*, 2003).



Figura 11: Loxoscelismo cutâneo. Local da picada por aranha-marrom. As cabeças de setas indicam edema e eritema e as flechas indicam o espalhamento gravitacional. Modificado a partir de Tambourgi, Gonçalves-De-Andrade *et al.*, 2010.

Classificação	Manifestações Clínicas	Tratamento
Leve	Lesão incaracterística, (sendo a <i>Loxosceles</i> identificada como causador do acidente), lesão local sugestiva, sem comprometimento do estado geral e sem alterações laboratoriais.	Sintomáticos: Analgésico, Antiinflamatório local e Acompanhamento até 72 h após picada
Moderado	Com ou sem identificação da <i>Loxosceles</i> no momento da picada, lesão sugestiva com <i>rash</i> cutâneo ou lesão característica < 3cm de diâmetro, com ou sem alterações sistêmicas e sem alterações laboratoriais, sugestivas de hemólise.	Prednisona (5 dias): Adultos 40 mg/dia e Crianças 1 mg/kg/dia SAAr ou SALox IV 5 ampolas
Grave	Lesão característica de instalação rápida (primeiras 36 h), com >3 cm de diâmetro, evidência de hemólise (palidez, anemia aguda, icterícia) confirmada laboratorialmente.	SAAr ou SALox IV: 5 ampolas (forma cutânea), 10 ampolas (forma cutâneo-visceral), Prednisona (7 a 10 dias): Adultos 40 mg/dia e Crianças 1 mg/kg/dia

Tabela 3: Acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles*: classificação quanto à gravidade, manifestações clínicas tratamento geral e específico. Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2001.

*SALox: Soro Antiloxoscélico.

**SAAr : Soro Antiaracnídico.

Outros problemas decorrentes do consumo dos fatores de coagulação, como sangramentos causados pela trombocitopenia e hipofibrinogenemia, deverão ser tratados conforme a necessidade. Habitualmente, está indicada cuidadosa assepsia da lesão, elevação do membro atingido e realização de compressas frias. Muitas vezes, é necessária a intervenção cirúrgica para a realização dos debridamentos e até mesmo de enxertos de pele (Cardoso, França *et al.*, 2003) (Figura 12).

Em Curitiba, o tratamento estabelecido é a utilização de prednisona, dapsona e soro anti-*Loxosceles* produzido no Centro de Produção de Produtos Imunobiológicos do estado (CPPI). O soro anti-*Loxosceles* é administrado apenas nos casos de loxoscelismo cutâneo-visceral e nos quais a aranha é identificada como *L. intermedia* ou *L. laeta*. Porém, o tratamento com prednisona deve ser iniciado mesmo na ausência da lesão dermonecrotica. O monitoramento do paciente deverá ser realizado nas primeiras 36 horas e caso exista quadro cutâneo severo há indicação da dapsona e soro anti-*Loxosceles* (SMS/CE/CVE, 2011). Se os sinais do

quadro sistêmico não iniciam dentro de 24 horas, fica estabelecido o diagnóstico de quadro cutâneo.



Figura 12: Evolução da picada da aranha-marrom “*L. reclusa*”. (A) 1º dia após a picada. (B) 2º dia após a picada, após cirurgia reparadora. (C) 9º dia após a picada, áreas pretas são os vasos sanguíneos cauterizados. (D) 38º dia após a picada, enxerto de pele no local com área doadora adjacente. (E) 38º dia após a pica da, vista do enxerto de pele. (F) Local da picada após 20 meses após a cirurgia. Modificado a partir de Loshier, 2009.

1.4 Características bioquímicas do veneno loxoscélico

O veneno da aranha-marrom é um líquido protéico produzido por um par de glândulas holócrinas situadas no cefalotórax do animal (Figura 9C e 9D), as quais se comunicam com o exterior através do aparelho inoculador, constituído por um par de quelíceras (Dos Santo, Franco *et al.*, 2000).

As células epiteliais das glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia* apresentam porções da membrana plasmática com invaginações, com uma grande quantidade de processos celulares interdigitais, o que aumenta a superfície secretora dessas células, sugerindo um elevado nível de stress celular causado pela dinâmica da excreção de veneno (Dos Santo, Franco *et al.*, 2000). Muitas vesículas

secretoras também são observadas no citoplasma próximas do Complexo de Golgi proeminente, que está presente sob a forma de uma pilha esmagada com uma dilatação característica em suas bordas. Essas porções do Golgi são facilmente reconhecidas, e são responsáveis por modificações pós-traducionais e glicosilação, o que concorda com dados anteriores que mostram que o veneno de *L. intermedia* é rico em glicoproteínas N-ligadas (Veiga, Gremski *et al.*, 1999). O volume de veneno e a massa protéica produzidos por essas glândulas variam entre as espécies. Por exemplo, um animal adulto da espécie *Loxosceles reclusa*, libera em média 4µl de veneno no momento da picada. Este volume de veneno pode conter aproximadamente de 30 µg de proteína. Enquanto a espécie *Loxosceles laeta* pode conter aproximadamente 215 µg de proteína (Binford e Wells, 2003).

Estudos mostram que os venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* são uma mistura de proteínas que apresentam perfil eletroforético similar, no qual existe predominância de proteínas de baixa massa molecular. Assim, para melhor descrever a composição do veneno, podemos separar esse perfil eletroforético em 4 grupos de proteínas: (a) um grupo de peptídeos, que se encontra no intervalo de 5-10 kDa, do qual fazem parte os peptídeos neurotóxicos, (b) outro grupo de proteínas com massa molecular encontradas no intervalo de 30-40 kDa, constituído principalmente pelas dermonecróticas, (c) um terceiro grupo, com amplo espectro de massa molecular, no qual se encontram as metaloproteases e, por último (d) um grupo de proteínas com alta massa molecular, no intervalo de 60-95 kDa, do qual fazem parte as serino-proteases (Da Silveira, Dos Santos Filho *et al.*, 2002; Da Silva, Da Silveira *et al.*, 2004; Silvestre, De Castro *et al.*, 2005).

Além de proteínas, na composição do veneno são encontrados íons, sais minerais, aminoácidos livres, aminas, poliaminas neurotóxicas e neurotransmissores (Escoubas, Diochot *et al.*, 2000). Estudos de identificação e caracterização das toxinas presentes nos venenos das aranhas do gênero *Loxosceles* revelaram a presença de metaloproteases, fosfolipases-D, hialuronidase, serino-proteases, além de lipase, esterase, fosfatase alcalina e 5'- ribonucleotidio-fosfohidrolase, como podemos observar na tabela 4 (Futrell, 1992; Da Silva, Da Silveira *et al.*, 2004; Da Silveira, Pigozzo *et al.*, 2007; Senff-Ribeiro, Henrique Da Silva *et al.*, 2008; Chaim, Trevisan-Silva *et al.*, 2011). Na figura 13 podemos visualizar a proporção das principais toxinas produzidas na glândula de veneno de *Loxosceles intermedia*.

Toxinas	MW (kDa)	Características e ações descritas
Fosfolipases-D (membros da família SicTox, como as LiRecDTs)	30–35	Várias isoformas com diferentes atividades: - Dermonecrose - Hidrólise de Fosfolípidos - Hemólise - Agregação plaquetária - Atividade inflamatória - Edema - Distúrbio Renal - Letalidade - Citotoxicidade <i>In vitro</i>
Peptídeos inseticidas (membros da família LiTx)	5–8	- Peptídeos relacionados à Magi 3 - LiTx: Letal para <i>S. frugiperda</i> (paralisa flácida) - LiTx3: atua sobre canais de Na ⁺
Metaloproteases	28–35	- Metaloproteases do tipo Astacinas (LALPs) - Presente no veneno de diferentes espécies de <i>Loxosceles</i> . - Atividade sobre gelatina, fibronectina, fibrinogênio e entactina
Hialuronidases	41–43	- Classificadas como hidrolases do tipo endo-β-N-acetyl-d hexosaminidases - Atividade sobre ácido hialurônico e condroitin sulfato - Presente no veneno de diferentes espécies de <i>Loxosceles</i> .
Serinoproteases	85–95	- Atividade gelatinolítica - Ativada <i>in vitro</i> pela tripsina - Presente no veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> e <i>Loxosceles laeta</i>
Inibidores de Serino/Cisteinoprotease	N.D.	- Pertencente superfamília das Serpinas - Identificada em transcriptomas e proteomas de <i>Loxosceles</i> spp. - Relacionada aos processos de coagulação, fibrinólise e inflamação

Tabela 4. Visão geral das famílias de toxinas encontradas nas aranhas do gênero *Loxosceles*. Modificado a partir de Chaim, Trevisan-Silva *et al.*, 2011.

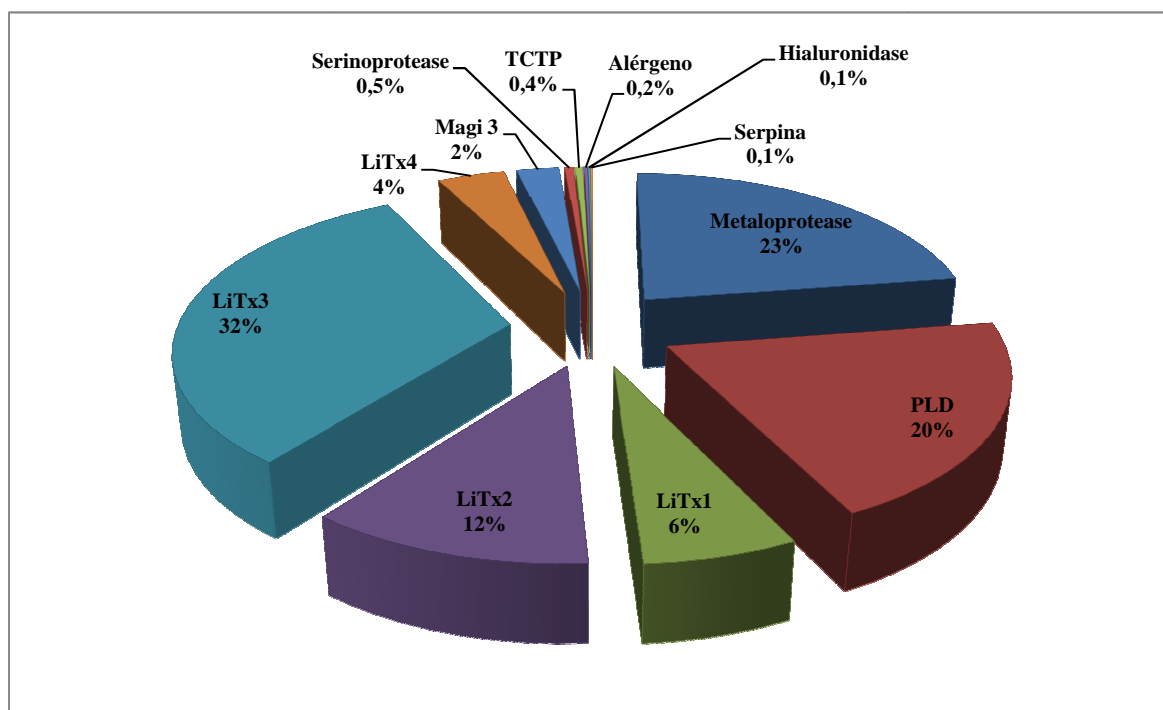


Figura 13: Proporções relativas de cada grupo de toxinas produzidas na glândula de veneno da *Loxosceles intermedia*. Modificado a partir do transcriptoma de Gremski, Da Silveira *et al.*, 2010.

Dos componentes citados acima, as fosfolipases-D são as toxinas que se encontram melhor caracterizadas bioquimicamente e cuja atividade biológica se encontra melhor estabelecida (De Andrade, Pedrosa *et al.*, 2005). A massa molecular média das fosfolipases-D é de 30 a 33 kDa. Já foram caracterizadas várias isoformas de fosfolipase-D nos venenos loxoscélicos; esta família de toxinas apresenta um alto nível de identidade e tem sido denominada de Loxtox por alguns autores (De Andrade, Pedrosa *et al.*, 2005). A família das fosfolipases-D é também conhecida como família das dermonecróticas, por serem as principais responsáveis pela dermonecrose (fator dermonecrótico). Elas apresentam atividade esfingomielinásica e podem promover agregação plaquetária, hemólise, letalidade, nefrotoxicidade e hiperpermeabilidade vascular (Da Silva, Da Silveira *et al.*, 2004; Chaim, Sade *et al.*, 2006; Kalapothakis, Chatzaki *et al.*, 2007; Kusma, Chaim *et al.*, 2008; Senff-Ribeiro, Henrique Da Silva *et al.*, 2008; Chaves-Moreira, Chaim *et al.*, 2009; Paludo, Biscaia *et al.*, 2009).

Atualmente, foram identificadas pelo menos 11 isoformas de fosfolipases-D no veneno de *L. gaucho* (Cunha, Barbaro *et al.*, 2003; Machado, Laugesen *et al.*, 2005). O nosso grupo já possui clonadas sete isoformas de fosfolipase-D de *L. intermedia*. Estas toxinas foram clonadas a partir da análise de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* e identificadas através do sequenciamento aleatório dos clones obtidos nessa biblioteca. As proteínas foram caracterizadas e, posteriormente, algumas destas isoformas de fosfolipases-D foram expressas como toxinas recombinantes em *E. coli* e purificadas para caracterização bioquímica e avaliação biológica. Desta maneira, já foram estudadas e caracterizadas as toxinas recombinantes LiRecDT1 (Chaim, Sade *et al.*, 2006), LiRecDT2 e LiRecDT3 (Da Silveira, Pigozzo *et al.*, 2006), LiRecDT4 e LiRecDT5 (Da Silveira, Pigozzo *et al.*, 2007), LiRecDT6 (Appel, Da Silveira *et al.*, 2008) e LiRecDT7 (Vuitika *et al.*, 2011). A isoforma LiRecDT1 é a mais abundante na glândula de veneno de *L. intermedia* e foi subclonada em vetor de expressão pET-14b. A imunogenicidade das proteínas recombinantes foi avaliadas por *western blotting*, sendo especificamente reconhecidas por soro hiperimune de coelho anti-veneno bruto de *L. intermedia* (Da Silveira, Pigozzo *et al.*, 2006; Appel, Da Silveira *et al.*, 2008)(DA SILVEIRA *et al.*, 2006). Recentemente, foi realizada uma mutação sítio dirigida na enzima LiRecDT1, que resultou na substituição da histidina presente no sítio ativo catalítico por uma alanina, originando a isoforma LiRecDT1 H12A. Esta toxina mutada apresentou uma redução drástica da atividade esfingomielinásica e uma capacidade muito reduzida em causar dermonecrose em pele de coelhos (Chaim, Da Silveira *et al.*, 2011).

No veneno da aranha-marrom, além das toxinas dermonecróticas, um outro grupo de destaque é o das proteases. Duas metaloproteases de baixa massa molecular foram primeiramente identificadas no veneno de *L. intermedia*, denominadas Loxolisina A e Loxolisina B. A primeira, com massa molecular de 20 - 28 kDa, apresenta atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica, enquanto, a segunda, com massa molecular de 32-35 kDa, apresenta atividade gelatinolítica. A atividade biológica dessas metaloproteases está possivelmente relacionada a distúrbios hemostáticos, hemorragia da derme, injúria de vasos sanguíneos, interferência na adesão plaquetária e, também, na dificuldade de cicatrização das lesões cutâneas (Feitosa, Gremski *et al.*, 1998; Veiga, Feitosa *et al.*, 2000; Veiga,

Zanetti, Braz *et al.*, 2001; Veiga, Zanetti, Franco *et al.*, 2001; Zanetti, Da Silveira *et al.*, 2002; Da Silveira, Wille *et al.*, 2007).

Atualmente, com o auxílio das técnicas de clonagem molecular algumas metaloproteases identificadas na glândula produtora de veneno de *L. intermedia* foram classificadas como membros da família das astacinas. As astacinas, juntamente com outras famílias de endopeptidases ligantes de zinco, como as matrilisinas (MMPs, collagenases), serralisinas (proteases bacterianas) e adamalisinas (proteases de venenos de cobra), podem ser classificadas como pertencentes a uma superfamília de metaloproteases chamada de Metzincinas. As principais características dos membros dessa superfamília são uma sequência consenso de ligação ao zinco (HEXXHXXGXXH) e um “Met-turn” na cadeia polipeptídica, promovido por um resíduo de metionina (Stocker e Bode, 1995; Stocker, Grams *et al.*, 1995; Da Silveira, Wille *et al.*, 2007; Senff-Ribeiro, Henrique Da Silva *et al.*, 2008; Trevisan-Silva, Gremski *et al.*, 2010). Esta metaloprotease do tipo astacina foi produzida como toxina recombinante e caracterizada por nosso grupo, sendo denominada LALP (*L*oxosceles *A*stacin-*L*ike *P*rotease) (Trevisan-Silva, Gremski *et al.*; Da Silveira, Wille *et al.*, 2007).

No veneno de aranha-marrom (*L. intermedia*) foram identificadas, também duas serino-proteases com massa molecular de 85 e 95 kDa. Ambas demonstraram especificidade substrato, sendo capazes de degradar a gelatina e muito fracamente a caseína (Veiga, Da Silveira *et al.*, 2000; Gremski, Da Silveira *et al.*, 2010).

A presença de hialuronidases também foi determinada no veneno bruto de *L. intermedia* através da degradação de ácido hialurônico (HA) e de resíduos de condroitin-sulfato proteoglicano (CS). Essas hialuronidases são hidrolases do tipo endo- β -N-acetil-D-hexosaminidase, que geram resíduo terminal N-acetilglucosamina após a clivagem do HA. Sua provável contribuição no quadro dermonecrótico consiste na extensão das lesões dermonecróticas e no espalhamento gravitacional (Da Silva, Da Silveira *et al.*, 2004; Da Silveira, Chaim *et al.*, 2007; Gremski, Da Silveira *et al.*, 2010). Recentemente Ferrer e colaboradores (2010) clonaram, expressaram e purificaram uma isoforma de hialuronidase na forma ativa presente e está em processo de caracterização. O efeito tóxico do veneno se deve à atividade em conjunto dos diferentes constituintes, ou seja, um efeito tóxico sinérgico (Geren, Chan *et al.*, 1976).

Além disso, através de um transcriptoma da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia* foi possível identificar a presença de outras toxinas. Como por exemplo, a de um alérgeno de *L. intermedia*, composto por 415 aminoácidos que possui peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático, típico de proteínas secretadas. Segundo Ferrer e colaboradores (2010), o alérgeno pertence à família CAP (proteínas ricas em cisteína) e possui alta similaridade com espécies de outros artrópodes como o parasita (*Ixodes scapularis*) e a aranha de jardim (*Lycosa singoriensis*). Esse fator alergênico pode ser capaz de desencadear reação alérgica e participar no desenvolvimento do Rash cutâneo observado nos acidentes com aranha marrom.

A proteína TCTP, do inglês *Translationally Controlled Tumor Protein*, foi também identificada na glândula de veneno de *L. intermedia*, e acredita-se que seja uma proteína regulada a nível traducional. Diversos trabalhos descrevem a TCTP em outros organismos e tecidos. Alguns autores costumam nomeá-las de acordo com suas características específicas como, fortilina, relacionado com sua atividade antiapoptótica e HRF (do inglês *histamine releasing factor*), que enfatiza a sua atividade extracelular e consequente liberação de histamina. Essa toxina apresenta baixa massa molecular (aproximadamente 20 kDa) e é amplamente expressa em diversos organismos e em 26 tecidos humanos, o que aponta para um papel fundamental em vias bioquímicas ou de sinalização. Extracelularmente, tem sido caracterizada por sua capacidade de degranular mastócitos provocando a liberação de histamina, normalmente em pacientes parasitados ou com alergia. Esta liberação de histamina pode ser dependente ou independente de IgE e acredita-se que possa existir a participação de um receptor específico de TCTP que leva à ativação dos mastócitos (Sade, 2009).

As isoformas de peptídeos inseticidas foram inicialmente descritas no veneno de *Loxosceles intermedia* (LiTx1, LiTx2 e LiTx3) por Castro e colaboradores (De Castro, Silvestre *et al.*, 2004) e mais recentemente foi identificada uma nova isoforma LiTx4. Esses inseticidas pertencem à superfamília das Knottinas, porque são pequenas proteínas ricas em pontes dissulfeto e possuem um “nó” de cistina. Esses componentes do veneno caracterizados biologicamente são polipeptídeos com massas moleculares variando de 5,6 – 7,9 kDa, e apresentaram atividade inseticida contra pragas altamente destrutivas, como *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera cosmioides*. De acordo com Gremski e colaboradores (2010) as

seqüências mais abundantes encontradas no transcriptoma de *L. intermedia* indicam que é a LiTx3 o peptídeo mais expresso na glândula produtora de veneno (Figura 13). A maioria desses peptídeos tóxicos parece ter como alvo muito específico subtipos de canais iônicos, receptores e transportadores localizados no sistema nervoso periférico ou central.

Recentemente, Gremski e colaboradores (2010) revelaram a presença de transcritos com grande similaridade com outra classe de peptídeos ligantes de canais iônicos. Esses peptídeos são bastante parecidos com neurotoxina “Magi 3” isolada do veneno da aranha *Macrothele gigas*. A Magi 3 é um peptídeo com massa molecular de 5,2 kDa e mostra efeito inibitório específico sobre canais de sódio de insetos. Essa propriedade é associada à habilidade de causar paralisia nos insetos, embora ainda não seja possível assegurar que tenha ação apenas sobre canais de sódio ou se também apresenta atividade inibitória sobre canais de cálcio (Gremski, Da Silveira *et al.*, 2010)

Nesse mesmo transcriptoma também foi verificada a presença de um inibidor de serinoprotease com similaridade com outros inibidores encontrados em diversos venenos, como, por exemplo, a Textilin-1 isolada do veneno da serpente *Pseudonaja*. Essa molécula se liga e bloqueia a atividade de serinoproteases, como da plasmina e da tripsina (Gremski, Da Silveira *et al.*, 2010).

Estudos de identificação, caracterização bioquímica e investigação efeito biológico das toxinas presentes no veneno de *L. intermedia* vêm sendo intensamente realizados. Entretanto, as atividades biológicas destas e de outras toxinas ainda não descritas, com possível aplicação biotecnológica, necessitam ser identificadas e melhor caracterizadas bioquimicamente. A clonagem e a expressão heteróloga de proteínas, possíveis com o advento da tecnologia do DNA recombinante e das ferramentas de estudo proporcionadas pela Biologia Molecular têm auxiliado na caracterização bioquímica dos venenos de *Loxosceles*, bem como na investigação de seus efeitos biológicos, proporcionado conhecimento científico de aplicação biotecnológica, o desenvolvimento de drogas farmacêuticas e de modelos de obtenção de fármacos para o tratamento dos eventos patológicos associados à picada das aranhas do gênero *Loxosceles*.

1.5 Fosfolipases-D (PLD)

A ação completa do veneno loxoscélico pode ser melhor compreendida quando se avalia a ação de sua principal toxina: uma fosfolipase-D. Inicialmente, esta toxina foi denominada esfingomielinase-D (SMase-D), porém, como essa enzima demonstrou ser capaz de hidrolisar amplo espectro de fosfolipídios esse termo tornou-se muito limitado para descrevê-la (Lee e Lynch, 2005). As fosfolipases-D caracterizadas nos diferentes venenos de espécies de *Loxosceles* estudados correspondem a enzimas de massas moleculares muito próximas entre si, e têm sido consideradas como isoformas de uma mesma enzima (Tavares, Peichoto *et al.*, 2011).

A presença de várias isoformas reflete um processo evolucionário comum encontrado no veneno da glândula das aranhas e este é o caso da *Loxosceles intermedia*. Várias isoformas possuem função biológica específica (como dermonecrose e/ou atividade esfingomielinásica) e essas características parecem ser úteis contra uma variedade de presas.

Kalapothis e colaboradores (2007) isolaram sequências de cDNA codificantes para toxinas dermonecróticas e nomearam esse conjunto de enzimas como uma família, denominada Loxtox. Com base nas sequências aminoacídicas, reuniram 6 grupos distintos dentro dessa família de toxinas. Ainda nesse estudo, verificaram que esses níveis de identidade eram significativos, estando entre 55% e 99%. Isso reflete, em particular, a conservação dos resíduos de aminoácidos 51-54 no *loop B* catalítico (domínio PCDC/S), 191-196 no *loop F* (domínio S/GDGITN) e 272-275 (domínio D/ENPW) presentes na região C-terminal. Além disso, existe também conservação do sítio catalítico, como os resíduos de aminoácidos H12, E32, D34, H48, D92 e K94.

As fosfolipases-D (30–35 kDa) são proteínas de domínio único que se dobram em um “TIM (α/β)₈ barrel” com a inserção de outras folhas- β e uma α -hélice (Figura 14). Esta enzima apresenta um loop catalítico (azul), um loop variável (verde), um loop flexível (vermelho) e outros loops curtos que cercam o sítio ativo (Figura 14). O loop catalítico contém um resíduo catalítico importante, a His47, que forma um gancho, devido à presença de uma ponte de dissulfeto (Cys51-Cys57). Uma rede de ligações de hidrogênio assegura a correta orientação do *hairpin* em relação ao núcleo da proteína. Essas enzimas podem ser agrupadas em duas

classes com base na sua sequência, estruturas e dados bioquímicos (Murakami, Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2006; De Giuseppe, Ullah *et al.*, 2011). A classe I, representada pela PLD I de *Loxosceles laeta*, é caracterizada pela presença de apenas uma única ponte dissulfeto (Cys51-Cys57) e um circuito hidrofóbico alargado (*loop* variável). Já a Classe II compreende PLDs que contêm uma ponte dissulfeto (Cys53-Cys201) intra-cadeia adicional ligando o *loop* flexível ao *loop* catalítico. Dependendo de sua capacidade de hidrolisar esfingomielina, são subdivididas em classes IIa (maior atividade catalítica) e IIb (menos ativa ou inativa) (Murakami, Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2005; De Andrade, Murakami *et al.*, 2006; Murakami, Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2006). O sítio catalítico é vinculado à presença de um íon Mg^{2+} e dois resíduos de histidina (His12 e His47), que são estritamente conservados em ambas as classes de PLDs do veneno da aranha. Na estrutura da LiRecDT1, o íon de Mg^{2+} é hexacoordenado pelos oxigênios da carboxila Glu32, Asp34, Asp91 e por uma molécula de água (figura 15) e dois oxigênios do PEG4 utilizado no procedimento de cristalização (De Giuseppe, Ullah *et al.*, 2011; Ullah, De Giuseppe *et al.*, 2011).

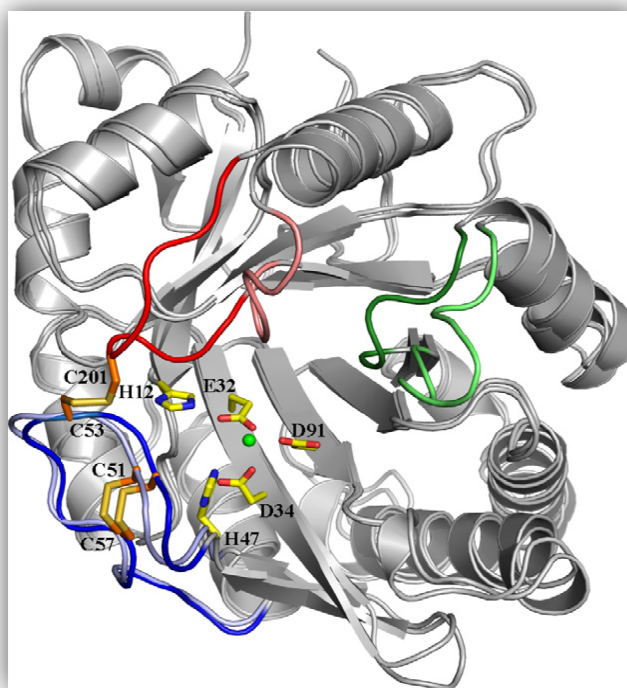


Figura 14: Alinhamento estrutural entre a LiRecDT1 de *Loxosceles intermedia* (classe II) e a PLD I de *Loxosceles laeta* (classe I). O íon Mg^{2+} é mostrado como uma esfera verde. Os *loops* catalíticos, flexíveis e variáveis são coloridos em azul, vermelho e verde, respectivamente. As cores escuras e as cores claras se referem a LiRecDT1 e PLD I, respectivamente. As pontes dissulfeto são apresentadas por barras laranja. Modificado a partir de Giuseppe *et al.*, 2011.

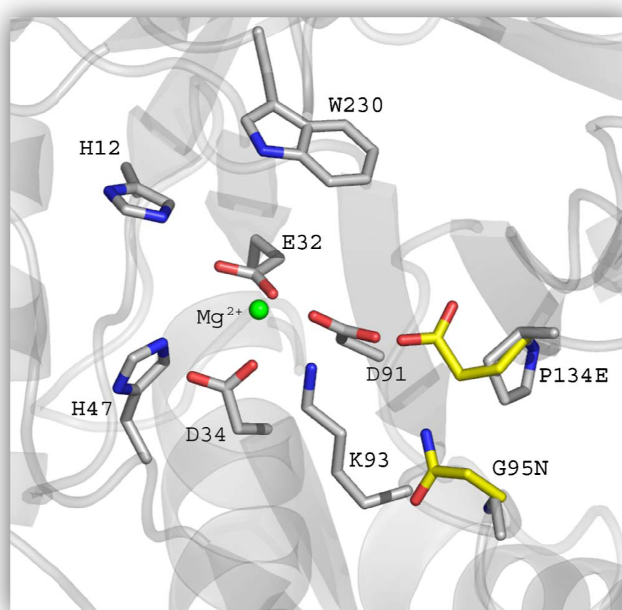


Figura 15: Diferenças entre os aminoácidos na entrada do sítio ativo da PLD Classe IIa (átomos em branco) e Classe IIb (átomos em amarelo). Modificado a partir de Murakami *et al.*, 2006.

Na classe II de PLD, o *loop* flexível é deslocado para o *loop* catalítico e parcialmente oclui uma fissura eletronegativa que leva ao sítio ativo na classe I de PLD (Figura 16). Isso resulta em uma redução volumétrica da cavidade que forma o sítio catalítico da classe II PLD. Além da ausência de uma ponte dissulfeto que liga o *loop* catalítico ao *loop* flexível, a protrusão do *loop* variável e a substituição N137G também contribuem para o alargamento da fissura em torno do sítio catalítico da classe I de PLD (Figura 16). Curiosamente, a fissura eletronegativa está escondida pelos *loops* catalítico e flexível na classe II de PLD, mas está exposta na classe I de PLD, devido à ausência da ponte dissulfeto que conectaria esses *loops*. A partir disso, de Giuseppe e colaboradores (2011) sugerem que essas diferenças observadas na topografia e distribuição do potencial eletrostático, na região do sítio catalítico, entre as classes I e II de PLDs podem ter diferentes maneiras de orientar o substrato e afinidades diferentes pelo substrato.

Quanto à atividade enzimática, essas enzimas realizam a hidrólise da esfingomielina com a formação de ceramida-1-fosfato (C1P) e colina, subprodutos envolvidos em importantes fenômenos biológicos (Hannun e Luberto, 2004; Kitatani, Idkowiak-Baldys *et al.*, 2008; Montes, Lopez *et al.*, 2008). Recentemente, Lee e Lynch (2005) mostraram que uma enzima de 34 kDa, clonada a partir da glândula

produtora de veneno de *L. reclusa*, foi capaz de hidrolisar não somente a esfingomielina, mas um amplo espectro de fosfolipídios, como por exemplo, lisofosfolipídios, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico e ácido fosfatídico cíclico. De acordo com esses dados, Van Meeteren e colaboradores (2004), utilizando uma toxina recombinante presente no veneno de *L. laeta* e caracterizada anteriormente como uma SMase-D, mostraram que a toxina apresentava atividade de hidrólise sobre a lisofosfatidilcolina (LPC), gerando ácido lisofosfatídico (LPA). Esse fosfolipídio é atualmente reconhecido como mediador lipídico pleiotrópico, que atua diretamente sobre determinados receptores relacionados com a sinalização intracelular via proteína G, e que são encontrados em diferentes tipos celulares. Assim, através da geração do LPA a fosfolipase-D poderia estar envolvida com fenômenos relacionados à agregação plaquetária, hiperpermeabilidade vascular e com a resposta inflamatória (Anliker e Chun, 2004a; b; Haseruck, Erl *et al.*, 2004).

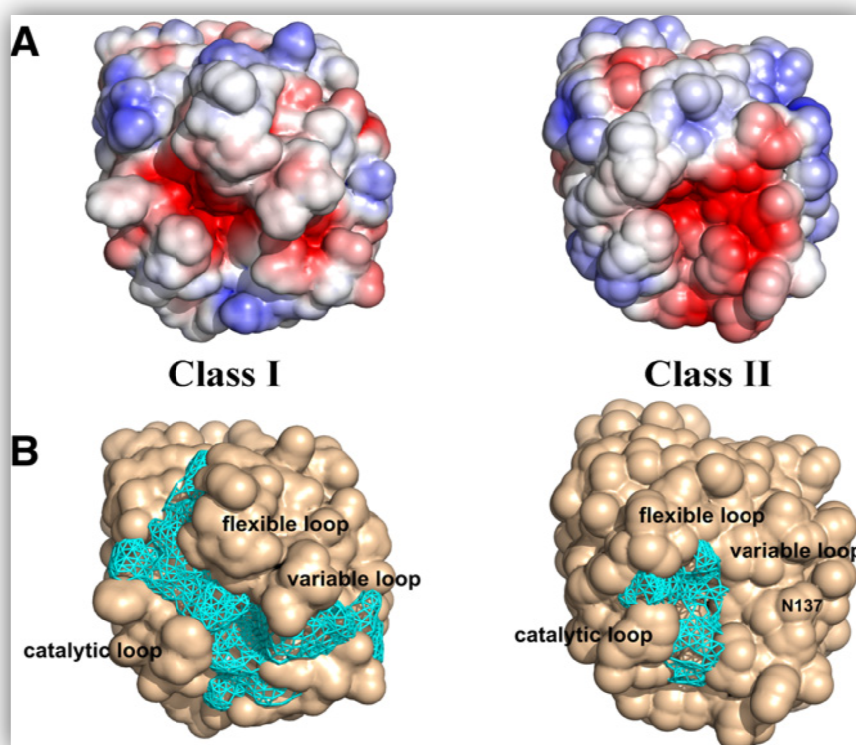


Figura 16: Análise da superfície das classes I e II de PLD com vista acessível ao solvente. (A) superfície eletrostática da classe I (à esquerda) e classe II (à direita) de PLDs são coloridas pela carga, vermelho (-2 kV) e azul (+2 kV). Potencial eletrostático foi calculado usando solvente PBEQ. (B) Representação das estruturas e cavidades (ciano) na respectiva classe I e II do PLD. Modificado a partir de Giuseppe *et al.*, 2011.

Murakami e colaboradores (2006) reportaram estudos estruturais, através de cristalografia por difração de raios-X, de uma isoforma de fosfolipase-D presente no veneno de *L. laeta*. Descreveram, também, o mecanismo catalítico de hidrólise da esfingomielina resultando na formação de (C1P) e colina, via íon dependente (Mg^{2+}), em um mecanismo ácido-base envolvendo duas histidinas presentes no sítio catalítico da enzima (His12 e His47). Na Figura 17, pode-se observar o *loop* catalítico (resíduos 46-60), que contém o importante resíduo H47 e o *Hairpin* na presença de uma ponte dissulfeto (Cys51 – Cys57). Neste mesmo estudo foi sugerida a participação do íon Mg^{2+} , presente no sítio catalítico, na coordenação e estabilização do “fosfonato” da esfingomielina durante a hidrólise. O íon Mg^{2+} é coordenado tetraedricamente por três resíduos de aminoácidos (Glu32, Asp34 e Asp91) e uma molécula de água.

Há indicações que a His47 comporta-se como o nucleófilo, a qual inicia o processo de hidrólise, pois ataca a ligação fosfodiéster do substrato. Já a His12 doa um átomo de hidrogênio para o intermediário penta-coordenado, o que resulta na formação da colina. Presumidamente, a His12 desprotonada é capaz de retirar um próton da molécula de água, iniciando um segundo ataque nucleófilo sobre o intermediário de reação, que, dessa vez, resulta na formação e liberação da ceramida-1-fosfato, como ilustrado na Figura 17.

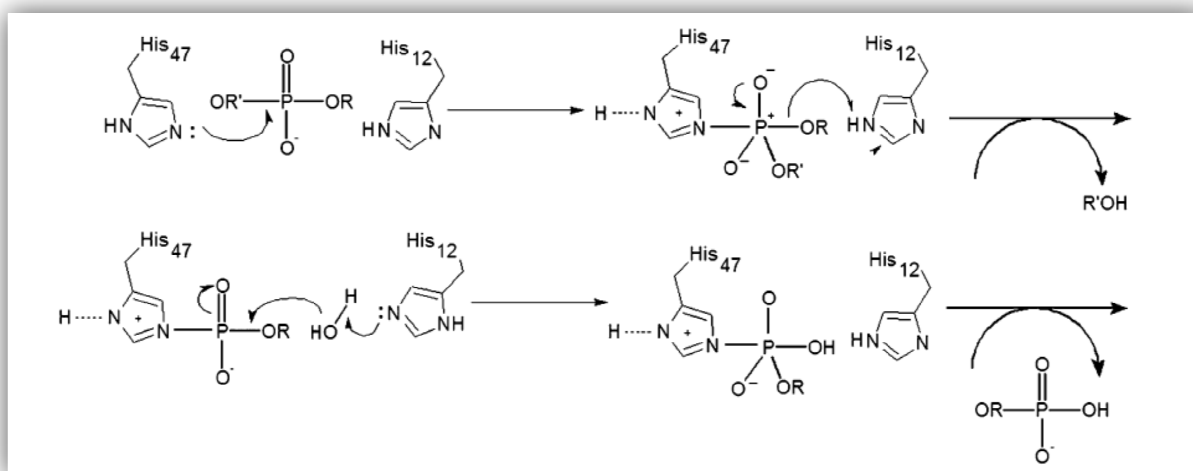


Figura 17: Mecanismo catalítico da fosfolipase-D. A hidrólise da esfingomielina resulta na formação de (C1P) e colina, via íon dependente (Mg^{2+}), em um mecanismo ácido-base envolvendo duas histidinas (His12 e His47) presentes no sítio catalítico da enzima. Adaptado de Murakami *et al.*, 2006.

Andrade e colaboradores (2006) descreveram uma análise estrutural comparativa entre a SMase de *L. laeta*, SMase1 e SMase2 de *L. intermedia* (ambas isoformas recombinantes de fosfolipase-D). Nessa análise observou-se que os aminoácidos envolvidos na catálise e no sítio de ligação ao íon metálico são estritamente conservados. Uma diferença encontrada entre elas é uma ponte dissulfeto adicional nas toxinas de *L. intermedia*. Foi demonstrado, também, que a SMase1 hidrolisa esfingomielina com menor eficiência que a SMase2. Essa menor atividade esfingomielinásica foi atribuída à substituição de um aminoácido na posição 203 (Pro→Leu), que alterou a hidrofobicidade do canal, que poderia desempenhar um papel no reconhecimento do substrato. Assim, pequenas modificações estruturais, tais como substituições sobre a superfície dos *loops*, podem afetar a atividade enzimática. Isso sugere, que além do sítio ativo das PLDs, existem outras regiões estruturais que participam no reconhecimento e ligação ao substrato.

A principal importância da atividade catalítica dessas fosfolipases-D se deve ao metabolismo da esfingomielina, considerando que a ação dessas toxinas é decisiva na patogênese decorrente do acidente com aranha marrom. Acredita-se que os metabólitos da esfingomielina possam modular uma variedade de eventos biológicos, que englobam desde a proliferação e diferenciação celular até fenômenos de apoptose (Anliker e Chun, 2004a; b; Marchesini e Hannun, 2004; Eyster, 2007a; b; Tani, Ito *et al.*, 2007). A ceramida-1-fosfato é uma molécula lipídica bioativa capaz de estimular a proliferação celular por aumento da síntese de DNA, inibir esfingomielinase ácida, bloquear a síntese de ceramida e ativar diretamente a fosfolipase-A₂ induzindo a produção de eicosanóides (Pettus, Bielawska *et al.*, 2004; Lamour e Chalfant, 2005; Pettus, Kitatani *et al.*, 2005).

1.6 A Atividade hemolítica do veneno

Muitos estudos experimentais utilizando venenos de animais têm sido realizados, muitas vezes são observados distúrbios hemostáticos, tais como eventos hemolíticos e hemorrágicos, sendo frequentemente associados com a atividade enzimática dos componentes desses venenos. O sistema complemento muitas vezes participa do processo hemolítico induzido por esses venenos. No caso do

envenenamento com a aranha-marrom, parece existir a indução e a ativação do complemento, o que facilita a hemólise (Futrell, 1992; Da Silva, Da Silveira *et al.*, 2004; Tambourgi, Gonçalves-De-Andrade *et al.*, 2010). Tambourgi e colaboradores (2000) verificaram que uma proteína de 35 kDa, purificada a partir do veneno total da *L. intermedia*, atua sobre a superfície de eritrócitos humanos promovendo a ativação do sistema complemento tanto pela via clássica quanto pela via alternativa, provocando hemólise complemento dependente. Acredita-se que a via clássica do sistema complemento seja ativada através da perda da assimetria da membrana eritrocitária, resultante da externalização de fosfatidilserina. A fosfatidilserina tem sido reportada como capaz de ativar o sistema complemento e, com isso, levar à formação do complexo de ataque à membrana (CAM), resultando em hemólise (Tambourgi, De Sousa Da Silva *et al.*, 2002). Finalmente, quando eritrócitos foram tratados com a fosfolipase-D recombinante de *L. intermedia* e incubados com soro humano C8-depurado (molécula que estabiliza a formação do complexo de ataque à membrana), observou-se aumento de C1q, uma proteína da via clássica do sistema complemento, que possui a capacidade de ligar anticorpo e promover a ativação do sistema complemento (Tambourgi, Pedrosa *et al.*, 2007). Acredita-se também, que outro possível mecanismo de indução da hemólise complemento dependente seria a ativação de uma metaloprotease endógena pela fosfolipase-D presente no veneno da aranha marrom. Essa metaloprotease endógena clivaria as glicoforinas presentes na superfície dos eritrócitos, tornando-os susceptíveis a hemólise pelo complemento (Tambourgui *et al.*, 2000).

O efeito hemolítico induzido pelo veneno da aranha *Loxosceles* é demonstrado com base nas características clínicas e laboratoriais observadas em vítimas dos acidentes. Essas características incluem níveis elevados de creatina quinase, hematúria, hemoglobínúria, proteinúria e choque (Williams, Khare *et al.*, 1995; Lung e Mallory, 2000). Os modelos animais confirmaram os dados clínicos dos pacientes envenenados, mostrando sinais de hemólise e lesões renais após veneno exposição. Estudos prévios caracterizaram uma toxina com atividade fosfolipase-D com base em sua atividade de hidrólise sobre fosfolipídios, como a esfingomiélin (Futrell, 1992). Os metabólitos que são gerados por essa enzima, como o ácido lisofosfatídico e ceramida-1-fosfato, podem ativar vias de sinalização em diferentes células e provocar alterações fisiopatológicas, como a resposta inflamatória,

agregação plaquetária, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e hemólise (Anliker e Chun, 2004a; b; Lee e Lynch, 2005).

Recentes estudos indicam que as isoformas recombinantes dessa fosfolipase-D da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* e uma isoforma mutada no sítio catalítico da enzima (H12A) participam diretamente do evento tóxico observado e que essa atividade é dependente da atividade dessas enzimas. Os dados experimentais apóiam também o envolvimento direto da atividade fosfolipase-D na atividade hemolítica evocada pelo veneno da aranha marrom. Recentemente alguns autores (Chaves-Moreira, Souza *et al.*; Chaves-Moreira, Chaim *et al.*) em 2009 e 2011 demonstram um efeito hemolítico direto em eritrócitos humanos expostos a fosfolipase-D recombinante selvagem. Essa toxina (LiRecDT1) induz hemólise de maneira dependente da concentração e tempo de exposição. A citotoxicidade dessa toxina foi adicionalmente confirmada por alterações dos eritrócitos que incluem poiquilocitose e anisocitose. Além disso, a hemólise observada após a exposição das células vermelhas do sangue com a toxina não é dependente dos sistemas ABO e Rh, uma vez que os eritrócitos lavados dos grupos A, B e O, bem como Rh positivo e negativo foram lisados de uma maneira similar após o tratamento com a toxina. Esses resultados suportam a hipótese de que essa reação não depende da compatibilidade do grupo sanguíneo. No entanto, a hemólise direta é dependente da espécie animal, uma vez que ovinos, humanos e roedores mostram porcentagem de hemólise diferentes. Acredita-se que quanto maior a porcentagem de esfingomielina maior é a susceptibilidade à fosfolipase-D.

A ligação da LiRecDT1 sobre os eritrócitos também causa reorganização lipídica da membrana plasmática, onde foi observada a externalização de fosfatidilserina. Tem sido demonstrado que aumentos nos níveis de ceramida após a ativação de esfingomielinases são um dos mecanismos que promovem a exposição fosfatidilserina nos eritrócitos. Foi mostrado também que esses efeitos são inibidos por quelantes de metais bivalentes, como EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina, que eficientemente inibem a lise das células humanas. Estes resultados suportam a idéia de que um íon metálico divalente é necessário para a atividade biológica da toxina na hemólise. Esses dados estão de acordo com os dados da literatura, sugerindo que a fosfolipase-D do veneno da aranha marrom contém um sítio de coordenação de magnésio, que desempenha um papel essencial na catálise enzimática. O envolvimento do sítio catalítico da toxina fosfolipase-D do veneno no processo de

hemólise foi finalmente provado através de uma mutação sítio dirigida na fosfolipase-D. No domínio catalítico desta isoforma, uma histidina (um aminoácido básico, carregados positivamente) na posição 12 foi substituído por um resíduo de alanina (aminoácido não polar) – LiRecDT1 H12A (Chaves-Moreira, Souza *et al.*; Chaves-Moreira, Chaim *et al.*, 2009; Chaim, Trevisan-Silva *et al.*, 2011). Os eritrócitos humanos expostos a toxina mutada (mesmo em concentrações mais elevadas do que aquelas usadas para a toxina selvagem) ao longo do tempo não mostrou hemólise. Da mesma forma, a mutação da toxina também bloqueou a atividade esfingomielinase-D desta enzima, demonstrando que as moléculas de esfingomielina na superfície celular dos eritrócitos estão envolvidas na lise dessas células. Algumas evidências indicam que a LiRecDT1 H12A ainda consegue interagir com a membrana do eritrócito, mas esta não resulta em mudanças morfológicas.

Porém, qual é o mecanismo pelo qual as toxinas fosfolipase-D do veneno da aranha marrom causa a hemólise direta de células? Acreditamos que a correlação direta entre a atividade da fosfolipase D e hemólise é devido ao fato de que as fosfolipases do veneno da aranha marrom podem gerar ceramida-1-fosfato e ácido lisofosfatídico, que são conhecidos metabólitos bioativos que induzem reações patológicas, como inflamação e agregação plaquetária (Anliker e Chun, 2004a; b; Haseruck, Erl *et al.*, 2004; Pettus, Bielawska *et al.*, 2004; Chalfant e Spiegel, 2005; Pettus, Kitatani *et al.*, 2005). Assim, pela geração de mediadores lipídicos a partir da membrana dos eritrócitos, a fosfolipase-D do veneno estimula mudanças estruturais da membrana citoplasmática (tais como a exposição de fosfolipídios carregados negativamente como fosfatidilserina). Isso, então, torna as membranas de células mais suscetíveis ao estresse fisiológico e, finalmente, contribui para a hemólise.

Sabe-se que a α -toxina de *Clostridium perfringens*, que exibe atividade fosfolipase-C (PLC) induz a hemólise de eritrócitos de carneiro devido à ativação do metabolismo da esfingomielina e da formação de esfingosina-1-fosfato (Ochi, Hashimoto *et al.*, 1996; Ochi, Miyawaki *et al.*, 2002; Ochi, Oda *et al.*, 2003). Recentemente, foi demonstrado também que a hemólise causada por essa toxina requer a participação de uma esfingomielinase endógena (Sakurai, Nagahama *et al.*, 2004; Oda, Ikari *et al.*, 2006; Oda, Matsuno *et al.*, 2008) e muitas das alterações morfológicas observadas como, por exemplo, *blebbing* de membrana e redução do tamanho, e exposição de fosfatidilserina na membrana externa são características

de morte dos eritrócitos (*eryptosis*) (Lang, Kaiser *et al.*, 2003; Lang, Lang *et al.*, 2005; Lang, Kempe, Myssina *et al.*, 2005; Lang, Kempe, Tanneur *et al.*, 2005; Lang, Huober *et al.*, 2006; Foller, Huber *et al.*, 2008; Foller, Sopjani *et al.*, 2009). Um dos caminhos estabelecidos para acionar a sinalização de *eryptosis* envolve a ativação de uma fosfolipase- A_2 endógena pela ceramida. Os níveis e efeitos da ceramida estão associados com aumento intracelular da concentração de Ca^{2+} (Chalfant, Szulc *et al.*, 2004; Chalfant e Spiegel, 2005; Lamour e Chalfant, 2008; Lamour, Subramanian *et al.*, 2009). Com base nos dados expostos acima, desencadeou a elaboração dessa presente tese, que procura elucidar quais são os mecanismos moleculares e vias de sinalização envolvidas na hemólise induzida pela fosfolipase-D.

Por fim, considerando tudo o que foi exposto sobre o quadro grave de loxoscelismo e avaliando as consequências desencadeadas pelos efeitos do veneno de aranhas-marrom, como por exemplo, o afastamento do trabalho, os prejuízos à saúde dos acidentados, o risco de vida e as sequelas deformantes que permanecem mesmo após a recuperação das vítimas, fica evidente a necessidade de uma melhor compreensão da atividade tóxica do veneno de *L. intermedia*, assim como de estudos detalhados dos mecanismos envolvidos na patogênese desses acidentes que propiciem novos métodos de diagnóstico e tratamento do loxoscelismo.

Lagarta:

“Lonomia obliqua”

1.7 Lagartas do gênero *Lonomia*

As lagartas compreendem uma das fases do ciclo de vida das mariposas e borboletas (forma adulta da ordem Lepidoptera) (Diaz, 2005a; b). As mariposas do gênero *Lonomia*, possuem hábitos noturnos e vivem de 8 a 10 dias. Neste período, não se alimentam, apenas acasalam. Fazem a postura dos ovos em folhas de plantas que servirão de alimento para as futuras lagartas. Os ovos permanecem incubados de 15 a 30 dias (Lorini e Corseuil, 2001). Após esse período, eles se rompem, surgindo então as taturanas (forma larval). À noite, as lagartas se alimentam das folhas da planta hospedeira. Durante o dia, ficam agrupadas no tronco, em repouso. Esta fase dura em média 90 dias. Após crescerem, descem para as partes mais baixas do tronco, próximo ao solo, onde se transformarão em pupas. Neste período, causam o maior número de acidentes. As pupas permanecem no solo sob restos vegetais por um período que pode variar de 30 a 100 dias, dependendo das condições climáticas. Após esse período, emergem das pupas as mariposas, reiniciando o ciclo na natureza. Ovos, pupas e mariposas do gênero *Lonomia* não causam acidentes (Figura 18).

Essas lagartas podem ser encontradas em vários ecossistemas pelo mundo (Balit, Geary *et al.*, 2003). Algumas vezes causando problemas em humanos como urticária, outros sérios problemas de saúde, e outras ainda como pragas agrícolas (Berger, Reck *et al.*, 2010). Embora essas lagartas possam ser encontradas em várias regiões, apenas algumas espécies são realmente capazes de promover danos em humanos (Alvarez-Flores, Furlin *et al.*; 2010). Quatro espécies estão envolvidas em acidentes humanos graves e fatais: *Lonomia obliqua*, *Lonomia achelous*, *Lonomia descimoni*, *Lonomia diabolus* (Tabela 5).

O gênero *Lonomia* inclui 26 espécies encontradas no continente americano (Ziereis, 2011). No Brasil encontramos quatro espécies dessas lagartas, como o ilustrado na Figura 20. A *Lonomia achelous* é encontrada na Bolívia, Venezuela, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, no norte do Brasil, Peru e Suriname. A *Lonomia descimoni* é encontrada na Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru, Suriname, e norte do Brasil. A *Lonomia diabolus* é encontrada no norte do Brasil e na Guiana Francesa. Já a *Lonomia obliqua* é encontrada Argentina, sul do

Brasil e no Uruguai. Essa espécie é considerada um problema de saúde pública no sul do país, pois o índice de acidentes é elevado (Hossler, 2009; Ziereis, 2011).



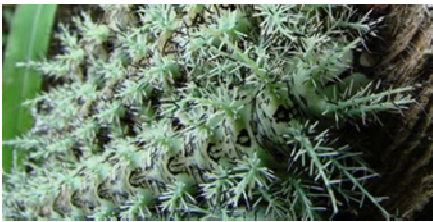

<i>Espécie</i>	<i>Característica</i>	<i>Dados adicionais</i>
<i>L. achelous</i>		<i>L.a.</i> Cramer, 1777
<i>L. descimoni</i>		<i>L. d.</i> Lemaire, 1972
<i>L. diabolus</i>		<i>L. d.</i> Draudt, 1929
<i>L. obliqua</i>		<i>L.o.</i> Walker, 1855

Tabela 5: Lagartas pertencentes ao gênero *Lonomia* presentes no Brasil. Modificado a partir de Ziereis, 2011.

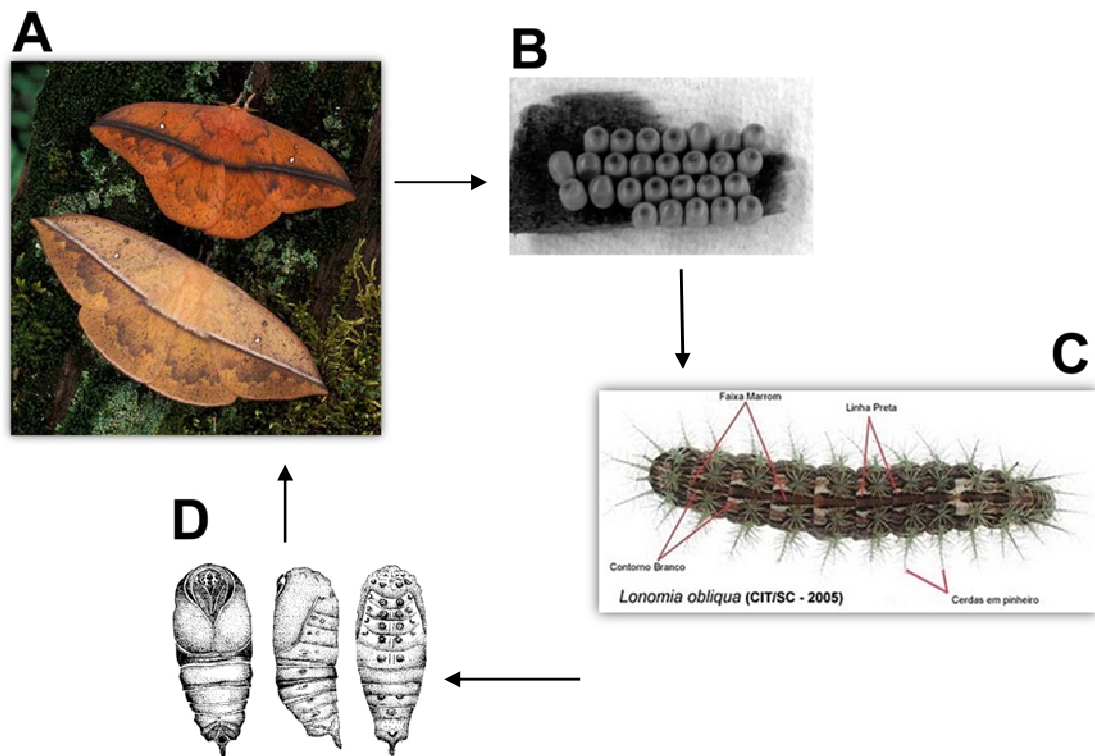


Figura 18: Ciclo de vida das Lagartas do gênero *Lonomia*. (A) Casal de Mariposas *Lonomia* sp. (B) Postura dos ovos de *Lonomia obliqua*. (C) Lagarta do sexto ínstar de *L. obliqua*, vista dorsal. (D) Pupas de *L. obliqua*: vista ventral, vista lateral e vista dorsal. Modificado a partir de Lorini e Corseuil, 2001.

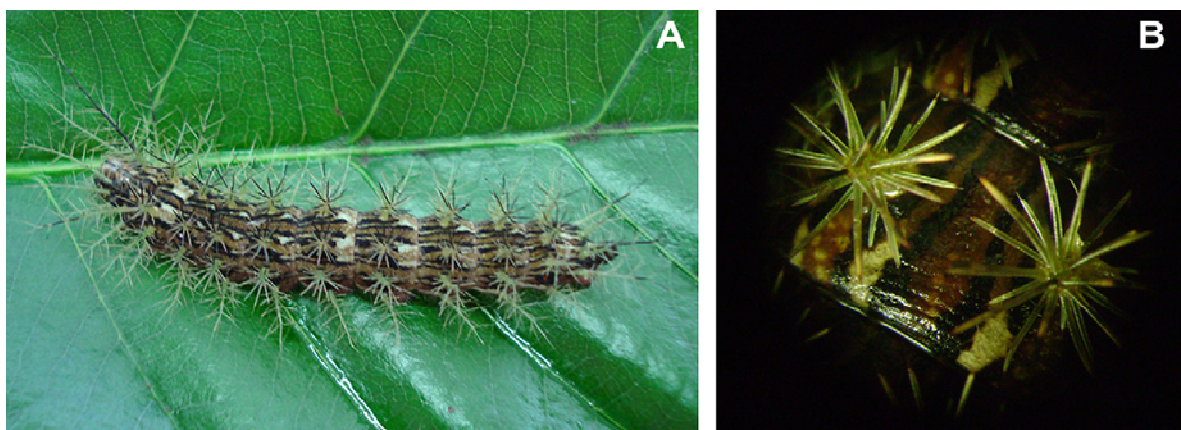


Figura 19: Fase larval da *Lonomia obliqua*. Têm cor marrom esverdeada e espinhos ramificados em forma de pinheiro, de cor verde. Um caráter distintivo é uma mancha branca em forma de "U" no dorso. (A) Estágio larval da *Lonomia obliqua* (6º instar). (B) Cerdas da *L. obliqua* em detalhe. Modificado a partir de Pinto, Berger et al., 2010.

1.8 Epidemiologia

Desde 1989, o número de acidentes com humanos causados por lagartas da espécie *Lonomia obliqua* tem aumentado na região sul do Brasil (Diaz, 2005b). Atualmente a lagarta *Lonomia* está identificada em 67 municípios (16%) do Estado do Paraná, mas em 13 municípios não ocasionaram acidentes (Rubio, 2001b).

Segundo a Sra. Edla Marília Rigoni da Secretaria Estadual de Saúde, no ano de 2010 foram registrados 48 casos no estado do Paraná, sendo que a cidade mais atingida foi Pato Branco com 19 casos (Gráfico 8). A incidência de casos letais é bastante relevante, com 55 óbitos registrados até o momento. A taxa de mortalidade relatada é de 2,7% como ilustrado pela figura 20 (Rubio, 2001a). Em sua maioria as vítimas são do sexo masculino (61%) (Gráfico 9), a faixa etária mais atingida é entre 5 e 9 anos (45%) (Gráfico 10), e as mãos são os locais de contato mais comuns (38%) (Gráfico 11).

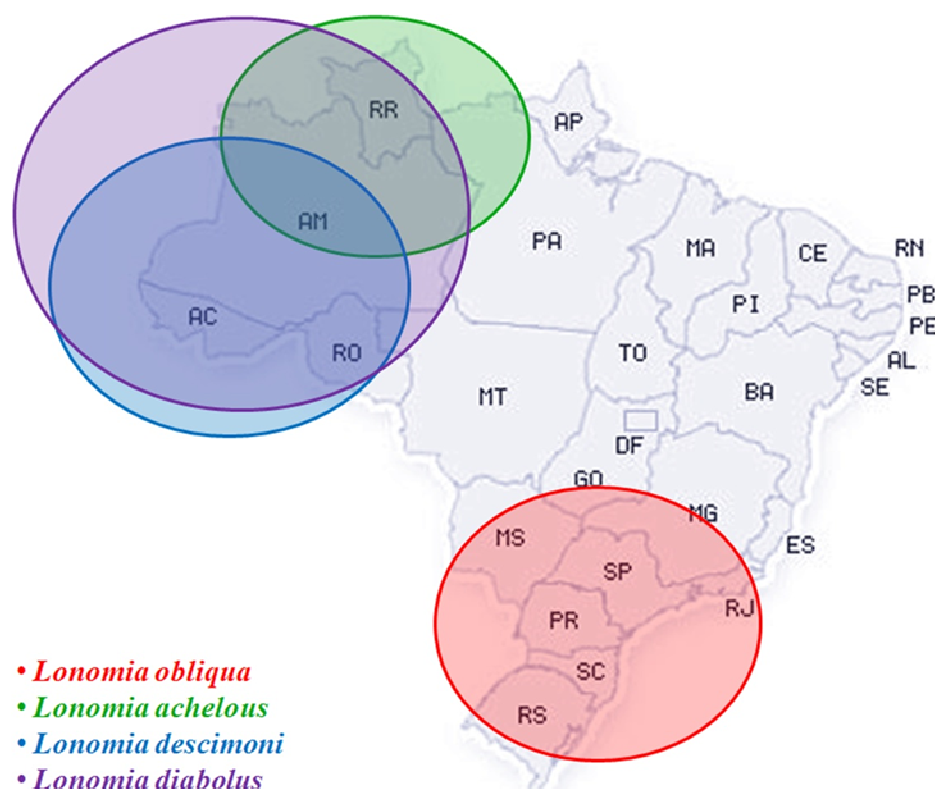


Figura 20: Distribuição geográfica das espécies de *Lonomia* presentes no Brasil.

Modificado a partir de Espindula, Ferraz *et al.*, 2009.

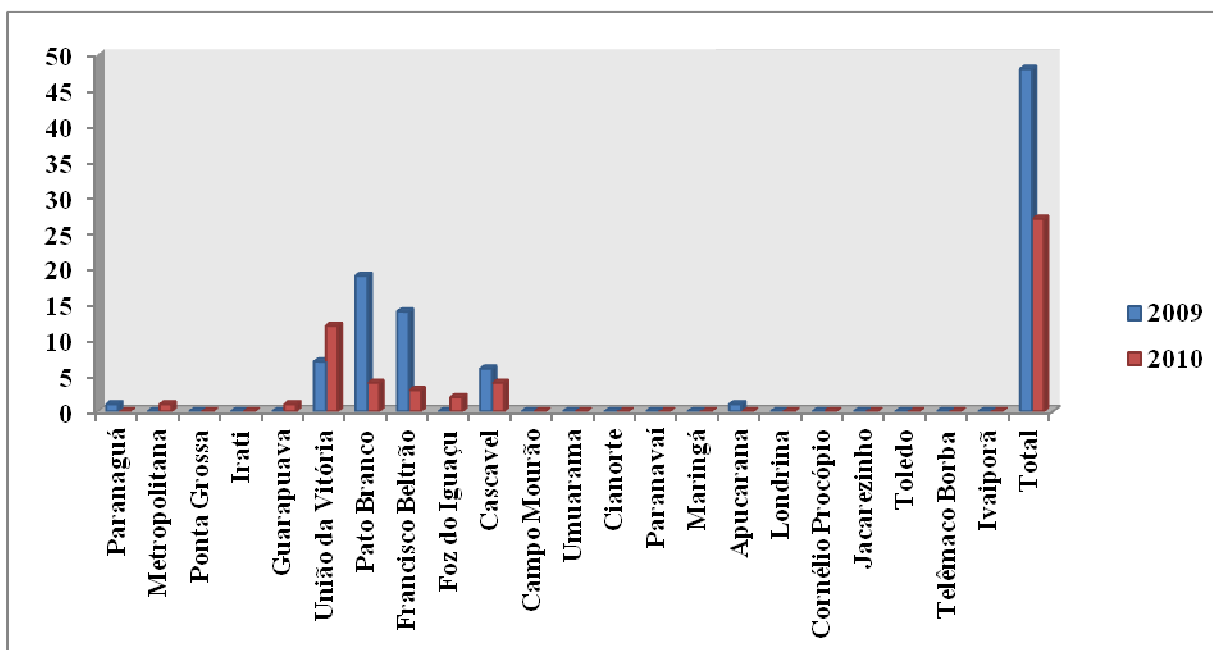
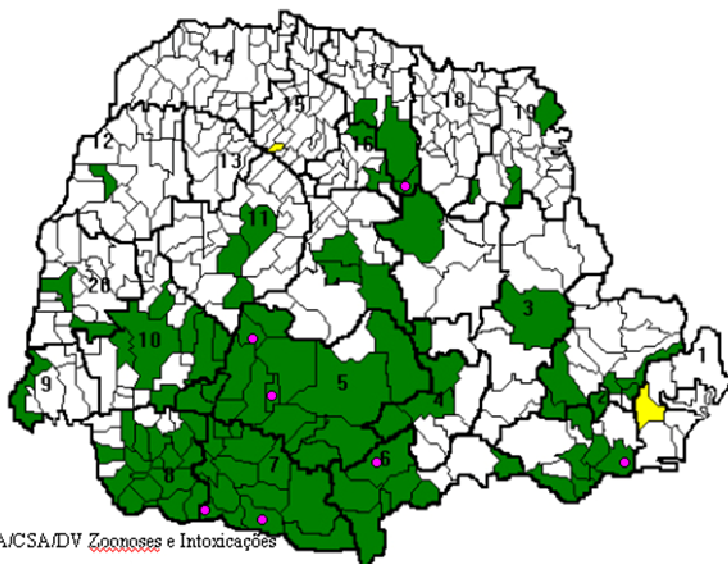


Gráfico 8: Incidência de acidentes com *Lonomia obliqua* no estado do Paraná nos últimos dois anos. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI-SINAN. *Dados atualizados em 06/04/2011. **Com permissão de Edla Marília Rigoni.

DISTRIBUIÇÃO DA LAGARTA *LOMONIA*/ACIDENTES NO ESTADO DO PARANÁ - 1989 A 2008*



Fonte SESA/CSA/DV Zoonoses e Intoxicações

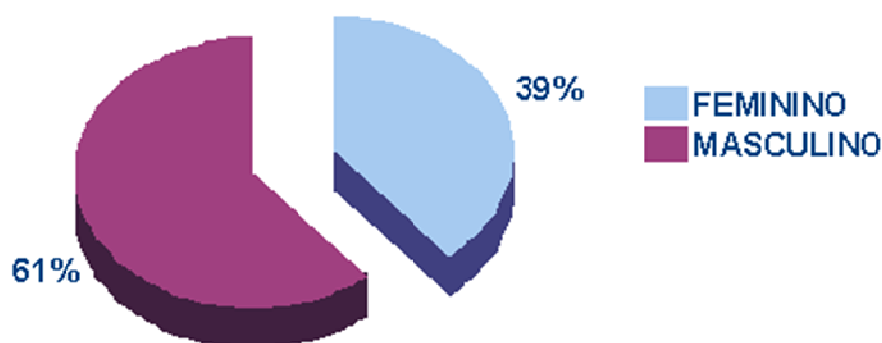
*dados parciais até 29/02/2008

● Identificação somente por mariposa (Dr Camargo e Monetes)

● Municípios com óbito

Gráfico 9: Distribuição da lagarta *Lonomia* e acidentes no estado do Paraná de 1989 a 2008*. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI-SINAN. **Com permissão de Edla Marília Rigoni.

**ACIDENTES CAUSADOS PELA LAGARTA
LONOMIA sp PARANÁ, 1995 a 2001* -
DISTRIBUIÇÃO POR SEXO (n=229)**

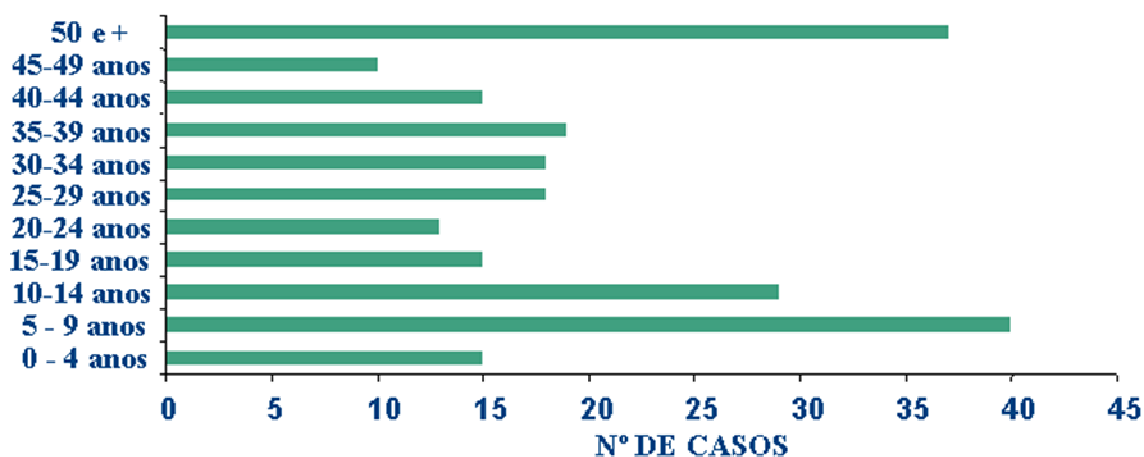


Fonte: SESA/CSA/DV Zoonoses e Intoxicações

* dados parciais a 30/09/2001

Gráfico 10: Incidência de acidentes com *Lonomia sp.* no estado do Paraná entre 1995 a 2001, de acordo com o sexo. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI-SINAN. **Com permissão de Edla Marília Rigoni.

**ACIDENTES CAUSADOS PELA LAGARTA LONOMIA sp,
PARANÁ, 1995 A 2001* - FAIXA ETÁRIA, (n=229)**

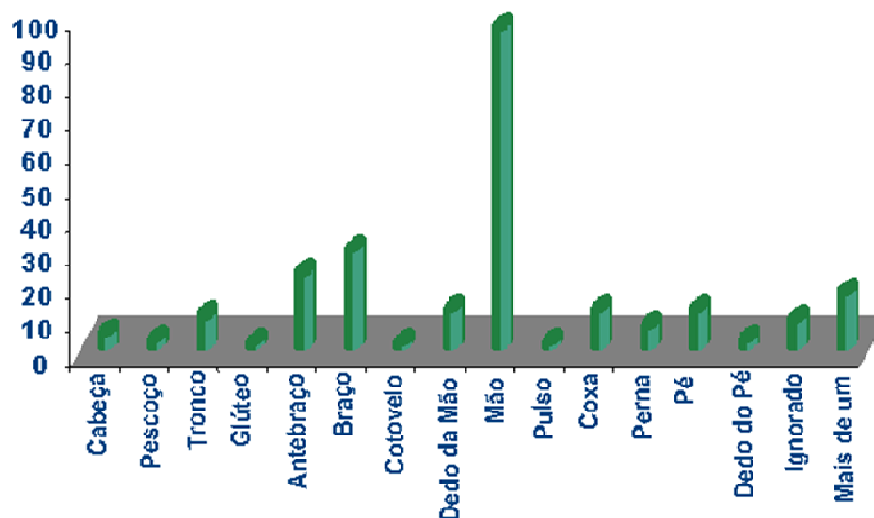


Fonte: SESA/Centro de Saúde Ambiental/DV Zoonoses e Intoxicações

* Dados parciais a 30/09/2001

Gráfico 11: Incidência de acidentes com *Lonomia sp.* no estado do Paraná entre 1995 a 2001, de acordo com a faixa etária da vítima. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI-SINAN. **Com permissão de Edla Marília Rigoni.

**ACIDENTES CAUSADOS PELA LAGARTA *LONOMIA* sp,
PARANÁ, 1995 a 2001* - LOCAL DE CONTATO, (n=229)**



Fonte: SESA/CSA/DV Zoonoses e Intoxicações

* dados parciais a 30/09/2001

Gráfico 12: Incidência de acidentes com *Lonomia* sp. no estado do Paraná entre 1995 a 2001, de acordo com o local de contato. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI-SINAN.

**Com permissão de Edla Marília Rigoni.

**COEFICIENTE DE LETALIDADE, POR ANIMAL PEÇONHENTO,
PARANÁ, 1987 a 2000***

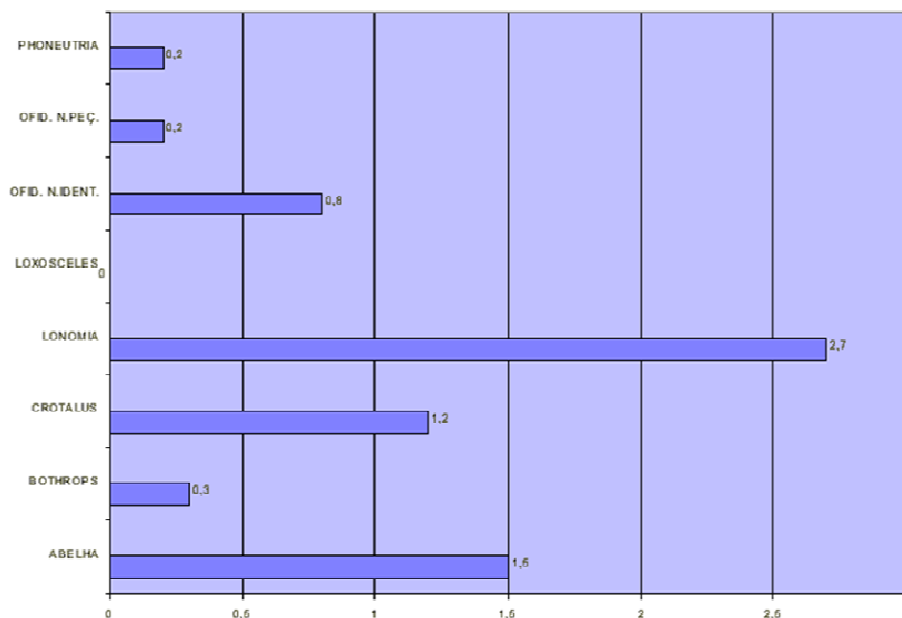


Gráfico 13: Coeficiente de letalidade por animal peçonhento no estado do Paraná de 1989 a 2000. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI-SINAN. **Com permissão de Edla Marília Rigoni.

1.9 O acidente com as lagartas do gênero *Lonomia*

A síndrome associada ao acidente com lagartas é conhecida como Erucismo e o Lepidopterismo é a síndrome desenvolvida pelo contato com as mariposas adultas de lepidópteros que é de relevância clínica mais limitada (Battisti, Holm *et al.*; 2011). O contato com as cerdas da lagarta provoca sintomas que variam de reações cutâneas leves a reações sistêmicas graves, dependendo da espécie envolvidas e as condições físicas da vítima, por exemplo, saúde, idade e peso corporal. Às vezes, o contato com os cabelos no ar ou com uma lagarta morta é suficiente para causar reações adversas (Balit, Geary *et al.*, 2003; Maier, Spiegel *et al.*, 2003). Os sintomas mais comuns incluem uma sensação de ardor, dermatite urticante e lesões na pele (Vega, Vega *et al.*, 2004). Algumas vezes podem ocorrer casos de alergia (Vega, Moneo *et al.*, 1997; Vega, Moneo *et al.*, 1999; Vega, Moneo *et al.*, 2000), lesões oculares (Sood, Tuli *et al.*, 2004), osteocondrite, distúrbios hemostáticos, assim como distúrbios renais e cerebrais (Da Silva, Campos *et al.*, 1996; Reis, Kelen *et al.*, 1999).

As cerdas dessas lagartas são espinhos rígidos preenchidos com uma secreção tóxica, veneno, que respondem à estimulação mecânica liberando o seu na pele da vítima quando pressionada (Figura 21 e 22) (Battisti, Holm *et al.*; 2011). Após o contato das cerdas de *L. obliqua* com a pele ocorre um forte processo inflamatório decorrente da presença do material que constitui as cerdas (quitina) e do seu conteúdo (veneno).

Na figura 23 podemos observar alguns sinais decorrentes do acidente com a *Lonomia obliqua*. Os principais sinais observados são ardência local, dor, eritema, edema, cefaléia, náuseas e vômito (Da Silva, Campos *et al.*, 1996; Donato, Moreno *et al.*, 1998; Arocha-Pinango e Guerrero, 1999; Reis, Kelen *et al.*, 1999; Veiga, Blochtein *et al.*, 2001), hematomas, hematúria, equimose (Arocha-Pinango, Marval *et al.*, 2000; Arocha-Pinango e Guerrero, 2001; Zannin, Lourenco *et al.*, 2003; Corrêa, Siqueira-Batista *et al.*, 2004a; Da Silva, Hyslop *et al.*, 2004) anemia e leucocitose (Arocha-Pinango e Guerrero, 2001). Hemorragias podem ocorrer na pele, mucosa e vísceras (Zannin, Lourenco *et al.*, 2003; Caovilla e Barros, 2004) As complicações potencialmente fatais incluem insuficiência renal aguda e hemorragia

intracerebral (Alvarez Flores, Zannin *et al.*; Pinto, Berger *et al.*; Alvarez Flores, Zannin *et al.*, 2011). A insuficiência renal aguda é observada em 2% dos pacientes admitidos após contato com *L. obliqua* (Gamborgi, Metcalf *et al.*, 2006), sendo que 10% desses desenvolvem insuficiência renal crônica. Os pacientes com insuficiência renal aguda apresentaram maior frequência de hematúria e maiores alterações nos parâmetros de coagulação. No entanto, a patogênese das complicações renais é desconhecida. Acredita-se que as alterações hemodinâmicas, como a isquemia renal com deposição maciça de fibrina nos capilares glomerulares estão associados a coagulação intravascular disseminada. O que não descarta possíveis ações diretas das toxinas do veneno nesta patogênese (Alvarez Flores, Zannin *et al.*; Berger, Reck *et al.*; Pinto, Berger *et al.*; Veiga, Pinto *et al.*, 2003; Gamborgi, Metcalf *et al.*, 2006; Alvarez-Flores, Furlin *et al.*, 2010; Alvarez Flores, Zannin *et al.*, 2011).

Segundo Arocha-Piñango e Guerrero (2001) a ocorrência de insuficiência renal é mais frequente após o contato com a espécie *L. obliqua* quando comparada com a espécie *L. achelous*. Os processos fisiopatológicos envolvidos na síndrome hemorrágica em pacientes após contato com as cerdas de *L. obliqua* e de *L. achelous* ainda não são completamente conhecidos. Porém, em estudos com a espécie *L. Achelous*, Arocha-Piñango e colaboradores (2003) sugeriram que a síndrome hemorrágica resultante do contato com a lagarta é causada principalmente pela ativação da fibrinólise e pela ocorrência de uma leve coagulação intravascular disseminada (Arocha-Pinango e Guerrero, 2001; 2003).

Além disso, os pacientes afetados podem apresentar também prolongamento do tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada. Observa-se ainda aumento no tempo de lise da *euglobulina* no plasma do paciente, indício de grave fibrinólise (Arocha-Pinango e Guerrero, 2003).

A redução da contagem de plaquetas e diminuição dos níveis de fibrinogênio são observadas quando existe a ocorrência de coagulação intravascular disseminada. Essas alterações são responsáveis pela gravidade das manifestações de sangramento. Algumas vezes os parâmetros hemostáticos de pacientes mostram depleção total de fibrinogênio (coagulopatia grave)(Amarant, Burkhart *et al.*, 1991; Levi, De Jonge *et al.*, 2002; Zannin, Lourenco *et al.*, 2003; Williams, Bellucci *et al.*, 2006). Todos estes dados indicam que a síndrome hemorrágica induzida pelo veneno de *L. Obliqua* é uma consequência da ativação intravascular sistêmica da

coagulação, levando a uma coagulopatia de consumo e ativação da fibrinólise secundária.

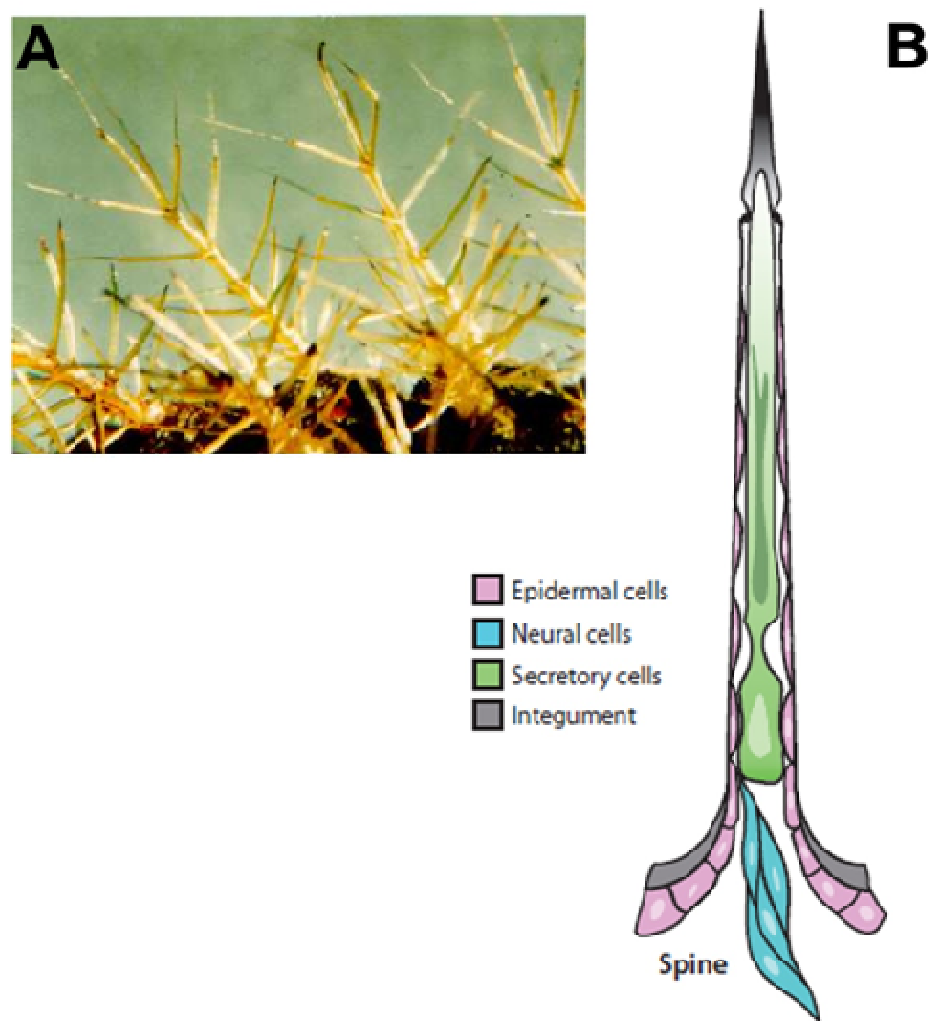


Figura 21: Detalhe do conjunto de cerdas (Scoli) da lagarta *Lonomia obliqua*. (A) Imagem do Scoli com as cerdas de *Lonomia obliqua*. (B) Representação esquemática das espículas que constituem as cerdas das lagartas da Família *Saturniidae*. Modificado a partir de Battisti, Holm *et al.*, 2011.

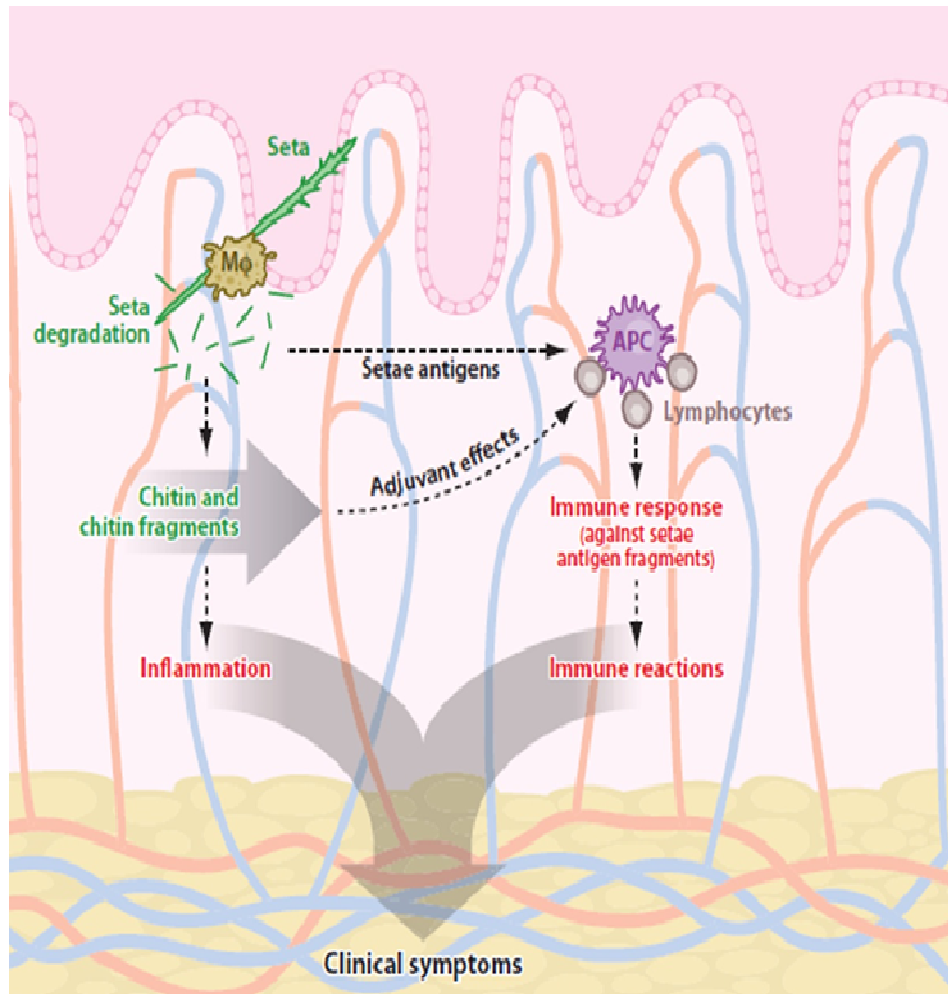


Figura 22: Ilustração do acidente com cerdas, indutores de inflamação e reações imunes na pele. Quando introduzidas nos tecidos, as cerdas induzem processos inflamatórios e imunológicos. Os macrófagos (Mφ) e outras células inflamatórias acumulam e tornam-se ativados. Algumas quitinases são sintetizadas pelas células da pele e essas quebram as cerdas quitinizadas. Os fragmentos de quitina, proteínas e outros componentes antigênicos são liberados. As proteínas das cerdas são absorvidas e processadas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) e apresentadas aos linfócitos, iniciando assim a proliferação de linfócitos e resposta imune específica. Os fragmentos de quitina promovem a inflamação e proliferação de linfócitos (efeito adjuvante), levando a vários tipos de reações alérgicas e outras reações imunes. Além disso, outros componentes das cerdas podem contribuir para a inflamação e estimulação do sistema imunológico. O resultado final é o dano tecidual, manifestações clínicas e doenças. Modificado a partir de Battisti, Holm *et al.*, 2011.



Figura 23: Vitima do contato na região cervical com a lagarta *Lonomia obliqua*. (A) Paciente E. F. M., sexo masculino, 15 anos, foi atendido na Emergência do Hospital São Vicente de Paulo em Passo Fundo (RS). (B) Equimose e edema submandibular e submentoniano, apresentando quadro obstrutivo de vias aéreas superiores com dispnéia progressiva de lenta evolução e coagulopatia devido ao contato com lagartas do gênero *Lonomia* há 48 horas. Modificado a partir de Basualdo, De Oliveira *et al.*, 2008.

1.10 Características bioquímicas do veneno de lagartas

Os venenos de Lagartas não foram estudados tão extensivamente como os venenos de serpentes, escorpiões, aranhas, abelhas e vespas. Porém, entre os venenos de lagarta mais estudados estão aqueles das mariposas dos gêneros *Thaumetopoea*, *Euproctis* e *Lonomia*. As lagartas do gênero *Thaumetopoea* (família Notodontidae), vulgarmente conhecida como lagartas de árvore processionária ou lagarta do pinho, são encontrados principalmente na Europa, mas algumas espécies também são encontradas nos Estados Unidos, Ásia e África (Diaz, 2005a; b). As cerdas são tóxicas, e a principal toxina ativa é um libertador de histamina, de 28 kDa denominada “thaumetopoeina” (Lamy, Pastureaud *et al.*, 1986). O contato com as cerdas pode desencadear desde manifestações mais simples, como dermatite até reações alérgicas e algumas vezes conjuntivite (Werno, Lamy *et al.*, 1993; Maier, Spiegel *et al.*, 2003).

As lagartas do gênero *Euproctis* (família Lymantriidae) estão distribuídas mundialmente e são comumente conhecidas como mariposas de cauda marrom

(Diaz, 2005a; b). As cerdas dessa lagarta são urticantes e provocam dermatite e bronquite alérgica (Balit, Geary *et al.*, 2003). O veneno dessas lagartas foi caracterizado parcialmente e contém hidrolases, fosfolipases e proteases.

Já as lagartas do gênero *Lonomia* (família: Saturniidae) possuem veneno que afeta principalmente o sistema de coagulação, como mencionado anteriormente. Os efeitos adversos observados são sangramento difuso, insuficiência renal e lesão cerebral, podendo evoluir para óbito (Amarant, Burkhart *et al.*, 1991; Arocha-Pinango, Marval *et al.*, 2000; Arocha-Pinango e Guerrero, 2001; 2003). Os acidentes são mais comuns em árvores frutíferas próximas de residências rurais, que geralmente contém “cachos de lagarta” (Corrêa, Siqueira-Batista *et al.*, 2004a). Duas espécies de *Lonomia* são mais comumente envolvidas nos acidentes com humanos: a lagarta brasileira *Lonomia obliqua* (Walker) e a lagarta venezuelana *Lonomia achelous* (Cramer). Os acidentes envolvendo as duas espécies causam sinais clínicos similares, mas o mecanismo pelo qual causam os seus efeitos adversos parece ser diferente. Aparentemente o veneno da *L. obliqua* possui atividade pró-coagulante e anticoagulante, enquanto o veneno de *L. achelous* tem apenas atividade pró-coagulante (Reis, Kelen *et al.*, 1999; Reis, Portaro *et al.*, 2001; Reis, Andrade *et al.*, 2006).

As principais toxinas identificadas no veneno de *L. achelous* são a Lonomin II, que possui atividade fibrinolítica direta e a Lonomin V, que degrada o fator de coagulação XIII (Arocha-Pinango, Marval *et al.*, 2000; Arocha-Pinango e Guerrero, 2003).

Em extrato de cerdas de *L. obliqua*, duas toxinas pró-coagulantes foram identificadas: um ativador do fator X, chamado Losac (ativador do fator Stuart de *L. obliqua*) e um ativador de protrombina chamado Lopap (ativador de protrombina de *L. obliqua*) e proteases (Reis, Farsky *et al.*, 2001; Alvarez Flores, Fritzen *et al.*, 2006). A Lopap parece ser um fator importante para o desenvolvimento da síndrome hemorrágica causada pelo contato com a essa lagarta (Reis, Kelen *et al.*, 1999; Reis, Farsky *et al.*, 2001). Nos últimos anos os estudos das propriedades biológicas do veneno presente nas cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* e seus mecanismos de ação avançaram de forma bastante significativa.

Recentemente, a análise de bibliotecas de cDNA de cerdas de *Lonomia obliqua*, revelou a presença de Serinoproteases, Hialuronidase, cisteíno-proteases, Serpinas, fosfolipase A₂ (PLA₂), Lipocalinas, lectinas, proteínas antibacterianas, toxinas com domínio Knot, inibidor do tipo Kazal e Cininogênio neste tecido (Pinto, Berger *et al.*; Chudzinski-Tavassi e Alvarez Flores, 2005; Veiga, Ribeiro *et al.*, 2005) (Gráfico 14).

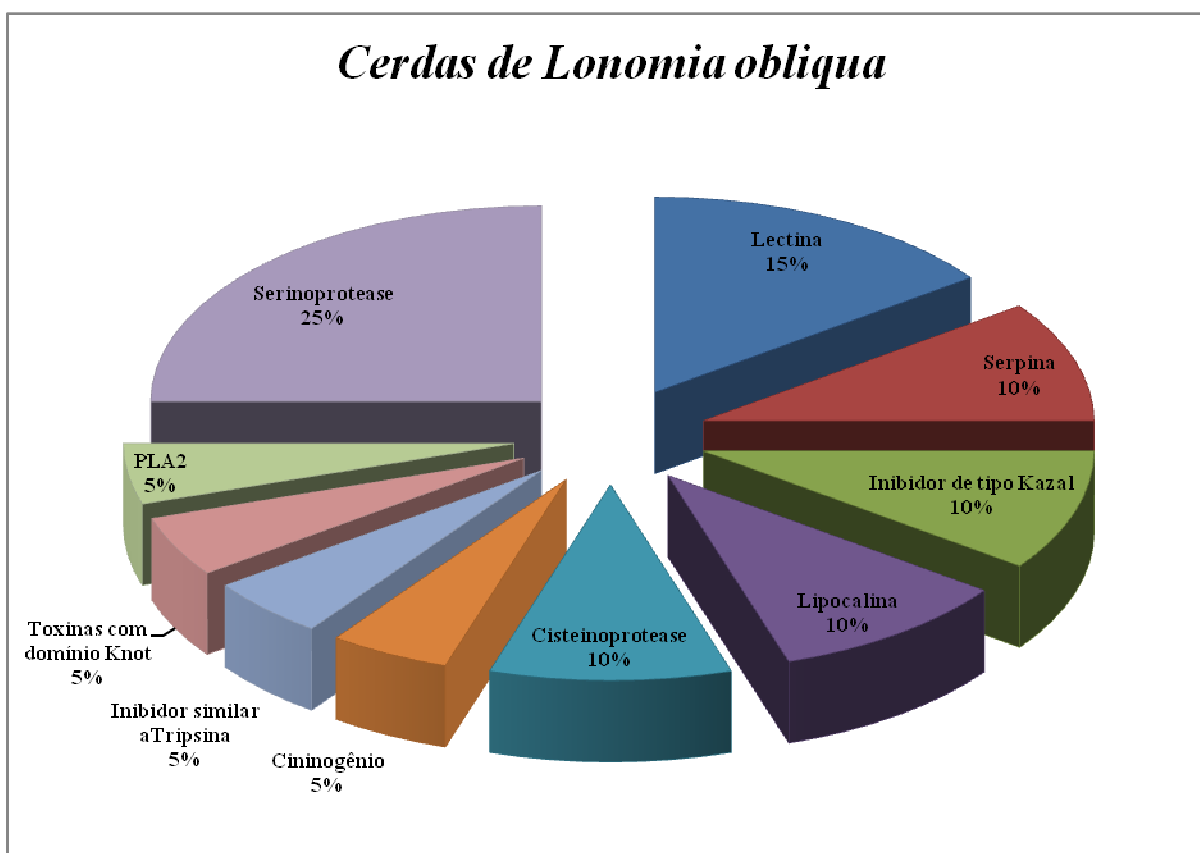


Gráfico 14: Distribuição das toxinas presente na cerda de *L. obliqua*. Percentagem dos clusters das toxinas presentes na biblioteca de cDNA das cerdas. Modificado a partir do transcriptoma de Veiga *et al.*, 2005.

1.11 Fosfolipase A₂ presente nas cerdas de *Lonomia obliqua*

As Fosfolipases são quase universalmente presentes em venenos animais. Em especial a fosfolipase A₂ é capaz de hidrolisar fosfolipídios de membrana, com a formação de ácido araquidônico e lisofosfolipídeos (Figura 24). Alguns autores acreditam que as fosfolipases A₂ possam inibir a coagulação sanguínea, por meio da interação com fatores de coagulação ou ainda pela degradação de fosfolipídios envolvidos na coagulação (Veiga *et al.*, 2005). Além disso, existem indícios de que essas fosfolipases A₂ possuam efeitos antiplaquetários (Berger *et al.*, 2010), neurotoxicidade (Shimabuku, Fernandes *et al.*, 2011) cardiotoxicidade (Sampaio, Hyslop *et al.*, 2010), miotoxicidade (Cotrim, De Oliveira *et al.*, 2011), atividade hemolítica (Inagaki, Yamauchi *et al.*, 2010) e capacidade de desenvolver inflamação alérgica (Lee e Kim, 2010).

Além disso, Veiga e colaboradores (1995) mostraram que as fosfolipases A₂ estão presentes nas cerdas de *Lonomia obliqua* e que apresentam homologia com outras fosfolipases A₂ presentes em venenos de abelhas e escorpiões. Essas fosfolipases apresentam um domínio carboxi-terminal similar as fosfolipases A₂ do Grupo III, cuja função está relacionada à liberação de ácido araquidônico nas células. As enzimas do grupo III têm sido principalmente isoladas do veneno de lagartos e de abelhas, principalmente as do gênero *Apis* (Arni e Ward, 1996). As enzimas pertencentes à Classe III exibem um baixo grau de homologia tanto com o grupo, quanto comparado com as classes I e II de PLA₂. No entanto, dois motivos mais comuns são evidentes: a região do sítio catalítico (32-39) na classe III e a região do sítio catalítico (44-51) nas classes I e II (**-CCxxHDxC**), assim como a região de coordenação ao íon cálcio no *loop* de ligação na classe III (10-14) e nas classes I e II (28-32) (**-W/YCGxG-**). Apesar dessas diferenças globais na sequência primária, secundária e terciária, elementos estruturais envolvidos na catálise e ligação aos íons cálcio são conservados entre as classes I, II e III de PLA₂ (Arni e Ward, 1996). Pode-se citar, por exemplo, o motivo estrutural da PLA₂ da classe III do veneno de abelha, formada pela ponte dissulfeto entre as duas hélices antiparalelas ligadas em conjunto com o *loop* de ligação ao Ca²⁺, inferindo uma estrutura conservada entre as PLA₂ da Classe III (Scott, Otwinowski *et al.*, 1990; Scott, White *et al.*, 1990). Os resíduos H34, D35, D64 e Y87 da PLA₂ do veneno de abelha que

estão envolvidos na catálise também são estruturalmente conservados. O resíduo His48 é estabilizado por uma ligação entre os átomos de oxigênio da carboxila do Asp66, que por sua vez é ligado ao hidrogênio do átomo de oxigênio da hidroxila do resíduo Tyr87. A His48, então se comporta como uma base de polarização e abstrai um próton de uma molécula de água, que em seguida, participa da formação de um intermediário tetraédrico. E dessa forma, após o colapso do intermediário e a liberação de produtos de hidrólise, três moléculas de água passam para o sítio ativo da enzima (Scott, Otwinowski *et al.*, 1990; Scott, White *et al.*, 1990).

Na figura 24 podemos visualizar um mecanismo proposto inicialmente para a hidrólise do éster sn-2 dos fosfolipídios pelas PLA₂, visto do sítio catalítico (Kuipers, Franken *et al.*, 1990; Kuipers, Kerver *et al.*, 1990; Kuipers, Van Den Bergh *et al.*, 1990; Thunnissen, Ab *et al.*, 1990). Esse primeiro mecanismo proposto é baseado em estruturas de raios-X de alta resolução de várias PLA₂ e pela conservação das características estruturais do sítio ativo, incluindo um Asp-His catalítico e um íon de Ca²⁺ ligados pelo loop catalítico (Figura 25A). Uma evidência adicional para este mecanismo veio a partir das estruturas de raios-X de diferentes PLA₂ contendo um análogo fosfonato ligado ao fosfolipídeo, uma suposta transição do estado analógico do inibidor (Lambeau e Gelb, 2008). No entanto, um segundo mecanismo de catálise para as PLA₂ foi proposto pelos mais recentes estudos cinéticos e de cristalografia realizados por Jain e Berg (2006). Este mecanismo envolve duas moléculas de água no sítio ativo, uma ligada ao cálcio (Figura 54D). Os dois mecanismos têm duas características comuns: a histidina que funciona como uma base geral para desprotonar uma molécula de água, e os íons de cálcio que estabilizam o oxianion derivados do oxigênio da carbonila do substrato (Lambeau e Gelb, 2008).

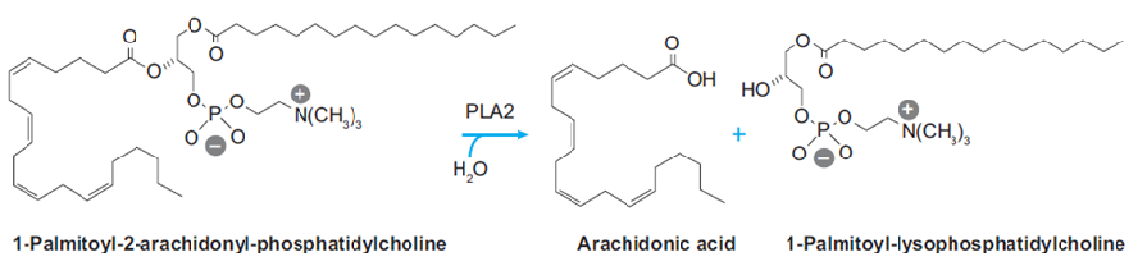


Figura 24: Reação catalisada pela PLA₂. Pode-se observar a hidrólise do éster sn-2 de 1-palmitoil-2 arachidonylphosphatidylcholine resultar em ácido araquidônico livre e 1-palmitoil-lisofosfatidilcolina. Muitas PLA₂s podem hidrolisar o éster sn-2 dos

fosfolipídios com outros grupos de cabeça polar e cadeias acil. Alguns substratos têm uma ligação éter na posição sn-1. Modificado a partir de Lambeau e Gelb, 2008.

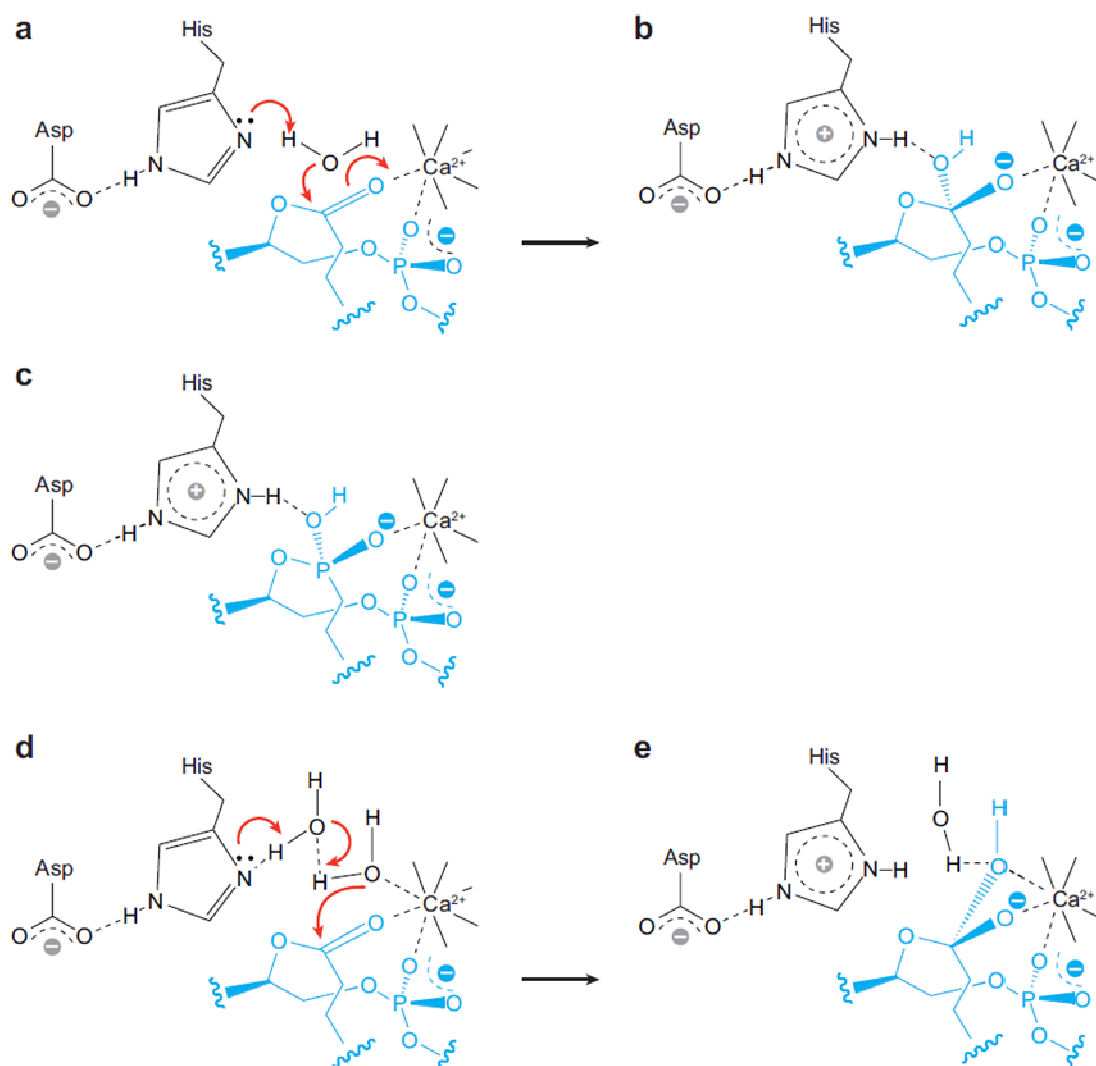


Figura 25: Mecanismo geral de hidrólise das Fosfolipases A₂. (A) O primeiro mecanismo proposto para a hidrólise de ésteres catalisada pelas PLA₂: Uma molécula de água ligada ao nitrogênio do imidazol da histidina ataca o carbono da carbonila do substrato com uma transferência de prótons concomitante da água para o nitrogênio do imidazol. O carbono da carbonila do substrato permanece vinculado ao cálcio catalítico. (B) Em seguida é formado intermediário tetraédrico derivado do mecanismo mostrado no painel a. O oxianion derivado do oxigênio da carbonila do substrato é estabilizado pela coordenação com o íon cálcio. (C) O análogo do fosfolipídeo-fosfonato ligado no sítio ativo, revelado por cristalografia de raios-X. A estrutura indicada imita o proposto no painel b. (D) Mecanismo proposto, por Jain e colaboradores, com duas águas. A água ligada ao cálcio age como nucleófilo, e um próton desta água foi transferido para a segunda molécula de água com a transferência de prótons da água para o anel imidazol da histidina. (E) Formação dos intermediários tetraédricos derivados do mecanismo mostrado no painel d. Substrato, substrato intermediário derivado e inibidores são mostrados em azul. Modificado a partir de Lambeau e Gelb, 2008.

Os resíduos hidrofóbicos na superfície interna da hélice N-terminal são altamente conservados, assim como a 'parede' que forma o canal hidrofóbico que dá acesso ao sítio catalítico. As contribuições adicionais para o canal hidrofóbico incluem o resíduo 19, que está localizado na única volta helicoidal após a hélice N-terminal e o resíduo 31 localizado dentro do domínio de ligação do cálcio (Figura 26).

Estudos de mutação sítio dirigida, em PLA₂ da classe III, indicaram que o resíduo 31 está envolvido na ligação, orientação do substrato lipídico e na blindagem do sítio ativo pelo solvente (Kuipers, Franken *et al.*, 1990; Kuipers, Kerver *et al.*, 1990; Kuipers, Van Den Bergh *et al.*, 1990; Thunnissen, Ab *et al.*, 1990). Também tem sido sugerido que essa região se torna mais ordenada quando existe a ligação em micelas. Outros aminoácidos contribuem para a formação do canal hidrofóbico estruturalmente conservado; isso inclui a ligação dos resíduos de Phe5, Ala104 e Phe106. A mutagênese do resíduo Phe106 resulta em uma redução na atividade catalítica, enfatizando a importância desse canal hidrofóbico para a ligação do lipídio intacto à enzima, e a restrição do livre acesso do solvente ao sítio ativo durante a catálise (Arni e Ward, 1996).

De acordo com Seibert e colaboradores (2006) a Fosfolipase A₂ presente no extrato bruto das cerdas de *Lonomia obliqua* purificada por cromatografia líquida apresenta uma massa molecular de 15 kDa, ponto isoelétrico de 5,9 e requer cálcio para atividade catalítica. Como já mencionado anteriormente a sequência da região N-terminal apresenta homologia com outras seqüências de PLA₂ e com uma sequência presumida de PLA₂ obtida a partir de uma biblioteca de cDNA de cerdas de *L. obliqua*. Essa enzima pode ser inibida por inibidor de PLA₂ específico (pBpb) e por quelantes de íons metálicos. Essa enzima parece também ser estável a 4°C, porém sensível a temperaturas mais altas. Apresenta atividade catalítica máxima em pH 8,0. Além disso, a PLA₂ purificada das cerdas de *L. obliqua* parece ser a responsável pela atividade hemolítica do extrato bruto das cerdas (Seibert, Shinohara *et al.*, 2003; Seibert, Oliveira *et al.*, 2004; Seibert, Tanaka-Azevedo *et al.*, 2006; Seibert, Santoro *et al.*, 2010).

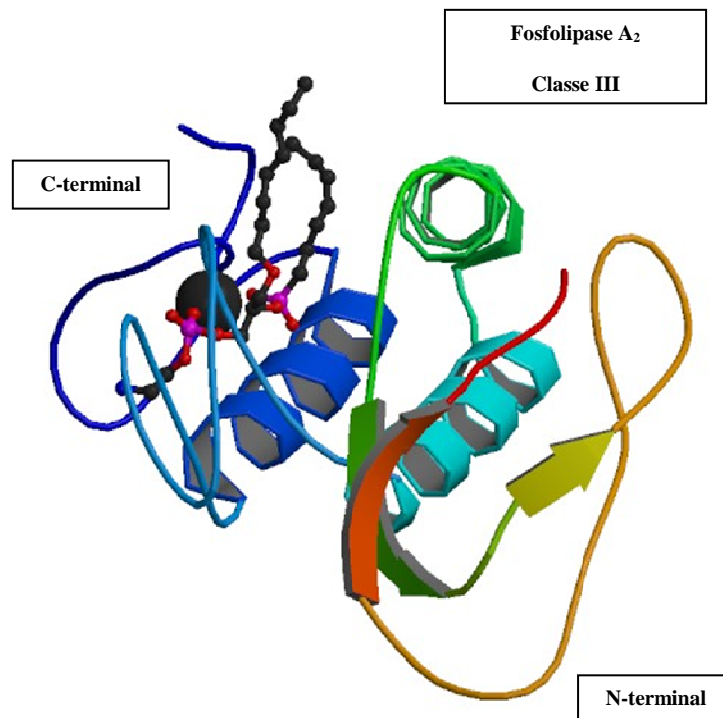


Figura 26: Estrutura da fosfolipase A₂ presente no veneno de abelha (*Apis mellifera*). Loop Catalítico (azul), Loop flexível (amarelo), íon Cálcio (esfera preta) e análogo do estado de transição (backbone). Modificado a partir de Scott *et al.*, 1990.

1.12 Hemólise intravascular após contato com lagarta *Lonomia obliqua*

O envenenamento acidental causado pelo contato da pele com as cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* causa distúrbios de coagulação e fibrinólise. Já alterações de parâmetros hematológicos e hemólise intravascular são observados somente em casos graves. Malaque e colaboradores (2006), relataram o caso de um homem de 64 anos de idade, que acidentalmente entrou em contato com uma lagarta *Lonomia*. Imediatamente após o contato, ele experimentou a sensação de queimação, edema e eritema no local de contato (mão direita). Posteriormente, ele começou a vomitar e desenvolveu dor de cabeça. Oito horas após o acidente, ele desenvolveu hematêmese, sangramento nas gengivas, e hematúria. Após o primeiro dia de internamento ele apresentou redução da concentração de hemoglobina e aumento

da concentração de bilirrubina indireta, características de hemólise intravascular. No segundo dia seu quadro piorou e ele foi diagnosticado com síndrome hemorrágica acompanhada por insuficiência renal aguda. Após alguns dias de tratamento e após ter recebido o soro antilonômico, apresentou melhora dos resultados dos testes de coagulação e não mais sinais de hemorragia. Apesar disso, houve ainda uma diminuição significativa nos níveis de hemoglobina (5,1 g / dL no quarto dia pós-incidente) e o paciente apresentou níveis mais baixos de plaquetas (18.000 /mm³). Havia suspeita de hemólise intravascular, pois o paciente apresentava níveis séricos de bilirrubina indireta e lactato desidrogenase (LDH) aumentados. A hemólise foi confirmada pelos níveis séricos de haptoglobina (10 mg/dL) e hemoglobina plasmática livre (1.220 mg/L) (Malaque, Andrade *et al.*, 2006). Esta complicação, entretanto, é bastante rara em seres humanos. Porém, Seibert e colaboradores (2004) conseguiram mostrar que o veneno de *L. obliqua* causa hemólise intravascular em ratos e mostraram também a atividade hemolítica “*in vitro*” do extrato das cerdas sobre eritrócitos de rato e de humanos (Seibert, Shinohara *et al.*, 2003). Aparentemente, os eritrócitos de ratos são mais susceptíveis a hemólise induzida pelo extrato das cerdas do que os eritrócitos humanos. Talvez, essa observação seja devido à porcentagem de fosfatidilcolina presente em diferentes proporções entre essas células.

A atividade de fosfolipase A₂ (PLA₂) no veneno de *L. obliqua* é a responsável pela atividade hemolítica do extrato de cerdas (Seibert, Tanaka-Azevedo *et al.*, 2006; Seibert, Santoro *et al.*, 2010). Essa atividade mostrou-se dependente do substrato (lecitina) e da concentração de cálcio. Semelhante a outras PLA₂, os íons cálcio desempenham um papel essencial no mecanismo catalítico da PLA₂ de *L. obliqua*, como observado pela inibição dessa atividade por EDTA (quelante de Ca²⁺). O inibidor específico *p-bromophenacylbromide* (pBpb) também inibe significativamente a atividade enzimática da PLA₂ de *L. obliqua*. O efeito desse inibidor específico de fosfolipase A₂ sugere fortemente que é a histidina presente no sítio ativo desta enzima que participa da atividade enzimática e hemolítica (Radvanyi e Bon, 1982).

Como comentado anteriormente, essa enzima hidrolisa fosfolipídios da membrana e produz um ácido graxo livre e um lisofosfolipídio. O substrato fisiologicamente mais relevante para as PLA₂ é a fosfatidilcolina, sendo comum a

liberação de ácido araquidônico (AA = ácidos eicosatetraenóicos), ácido graxo importante para a resposta inflamatória (Figura 27). O lisofosfolípídio resultante, a lisofosfatidilcolina (LPC), interage com receptores GPCRs específicos (Eyster, 2007a; b) e ativa a PLC para liberar IP3 e DAG, gerando aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} e ativação de PKC (Figura 28). Além disso, a LPC regula a MAPK de forma dependendo do tipo celular. A ativação da MAPK pela LPC ocorre por meio de uma ligação entre os GPCRs e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Eyster, 2007a; b). O receptor GPCR para LPC é encontrado em níveis mais elevados no baço e timo por isso desempenha um papel importante na regulação do sistema imune. Já o AA liberado pela PLA2 é o substrato para três caminhos diferentes: para a via da ciclooxigenase (COX), da lipoxigenase (LOX) e do citocromo P-450 2C (CYP2C). A isoforma COX2 é induzida por ligantes extracelulares e promove a produção de prostaglandina (PGE_2), importante indutor pró-inflamatório, em especial os eritrócitos (Lang, Kempe *et al.*, 2005). Esses mensageiros lipídicos estão envolvidos em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos (Figura 27 e 28), inclusive naqueles desencadeados pelas enzimas presente nas cerdas de *Lonomia obliqua*, tais como dor e inflamação observado em humanos e animais e manifestações sistêmicas, como a hemólise intravascular (Corrêa, Siqueira-Batista *et al.*, 2004b; Malaque, Andrade *et al.*, 2006; Seibert, Tanaka-Azevedo *et al.*, 2006).

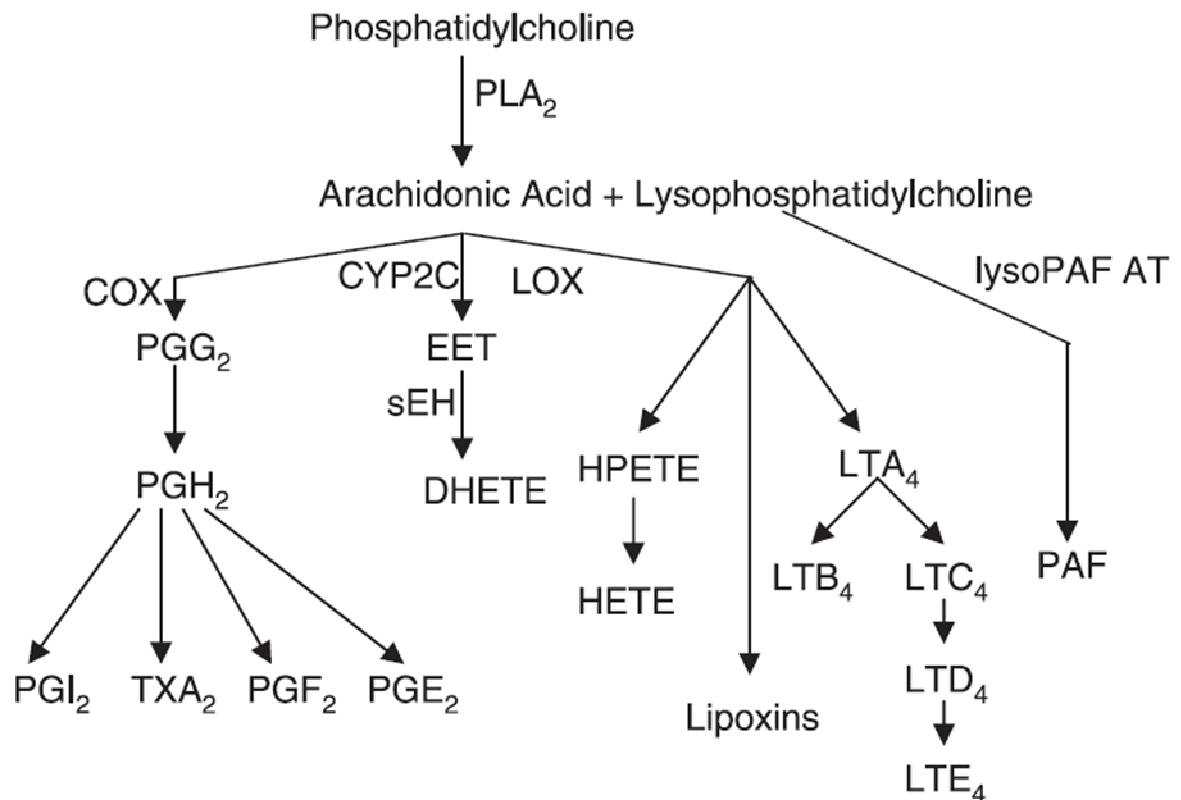


Figura 27: Metabólitos formados através da atividade da PLA₂. O ácido araquidônico (AA), liberado pela ação da PLA₂ sobre a fosfatidilcolina, é a “*molécula alvo*” para a produção de uma variedade de mediadores lipídicos pró-inflamatórios. A ação da COX sobre o AA produz as moléculas mediadoras da família das prostaglandinas (PG). A ação do CYP2C sobre o AA dá origem a EET. O EET é metabolizado em ácido dihydroxyepoxyeicosatrienoico (DHETE) pela epóxido hidrolase solúveis (sEH). As isoenzimas LOX darão origem aos leucotrienos (LTs), HETE, HPETE e lipoxinas. A lysoPAF AT converte LPC, também lançado pela ação da PLA₂ sobre a fosfatidilcolina em fator ativador de plaquetas (PAF). Modificado a partir Eyster, 2007.

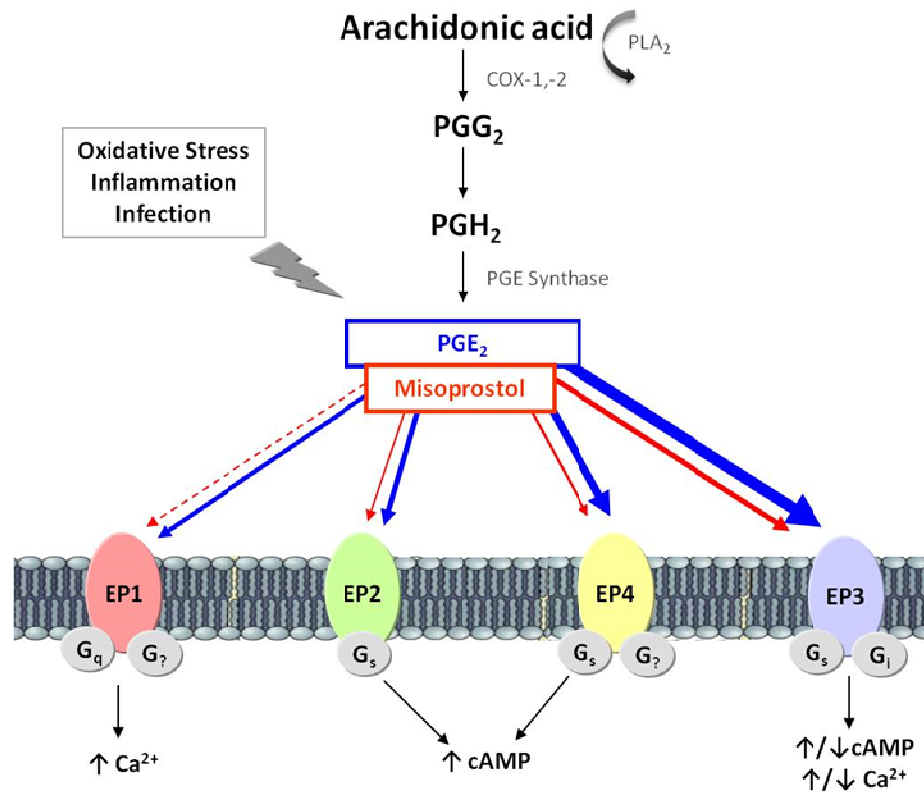


Figura 28: Sítios alvos da prostaglandinas. Várias moléculas bioativas de ácido graxo como o ácido araquidônico (AA) podem ser liberadas normalmente a partir de fosfolípidios de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) e, posteriormente metabolizadas em vários tipos de prostanóides bioativos. A enzima ciclooxigenase-1 (COX-1), forma constitutiva, ou a ciclooxigenase-2 (COX-2), forma induzível, converte AA para formar PGG₂ intermediário instável e depois para formar PGH₂, precursor prostanóide, que é metabolizado para formar as prostaglandinas (PG), importantes lipídios mensageiros no processo de sinalização. A PGE₂ é uma molécula sinalizadora envolvida na inflamação, dor ou plasticidade sináptica no sistema nervoso. Ela exerce os seus efeitos através da ativação de seus respectivos receptores G-protein-coupled (GPCRs), chamadas de receptores EP (EP1-4). Modificado a partir de Tamiji e Crawford, 2010.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Caracterizar bioquímica e biologicamente as toxinas recombinantes (Fosfolipases-D) obtidas a partir da glândula produtora de veneno de *L. intermedia*, assim com a toxina recombinante (Fosfolipase A₂) da cerda de *L. obliqua* e avaliar a relação com atividade catalítica dessas toxinas, assim como investigar os possíveis mecanismos envolvidos efeito hemolítico.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Clonar, expressar e purificar na forma recombinante as isoformas de Fosfolipase-D presentes no veneno de *L. intermedia* e de Fosfolipase A₂ presentes nas cerdas de *L. obliqua*;
- ✓ Avaliar a atividade enzimática das toxinas recombinantes obtidas na forma pura e ativa;
- ✓ Avaliar a atividade hemolítica direta das toxinas recombinantes sobre eritrócitos humanos;
- ✓ Avaliar o efeito de agentes quelantes de íons divalentes e outros inibidores enzimáticos sobre a atividade hemolítica direta dessas toxinas recombinantes;
- ✓ Avaliar os efeitos das toxinas recombinantes sobre eritrócitos de diferentes animais;
- ✓ Observar os efeitos dessas toxinas recombinantes sobre a morfologia de eritrócitos humanos;

- ✓ Detectar se há ligação ou interação das toxinas recombinantes, com eritrócitos *in vitro*;
- ✓ Verificar se as toxinas recombinantes promovem alterações no perfil de distribuição dos microdomínios lipídicos da membrana eritrocitária;
- ✓ Averiguar se as toxinas recombinantes são capazes de alterar a assimetria da membrana eritrocitária, por exposição de fosfatidilserina.
- ✓ Investigar a participação da atividade catalítica da Fosfolipase-D na atividade hemolítica, utilizando uma toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A.
- ✓ Investigar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na atividade hemolítica dessas toxinas recombinantes.

Identification of a Direct Hemolytic Effect Dependent on the Catalytic Activity Induced by Phospholipase-D (Dermonecrotic Toxin) From Brown Spider Venom

Daniele Chaves-Moreira,¹ Olga M. Chaim,^{1,2} Youssef B. Sade,¹ Kátia S. Paludo,^{1,3} Luiza H. Gremski,^{1,2} Lucélia Donatti,¹ Juliana de Moura,⁴ Oldemir C. Mangili,⁵ Waldemiro Gremski,^{1,6} Rafael B. da Silveira,⁷ Andrea Senff-Ribeiro,¹ and Silvio S. Veiga^{1*}

¹Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

²Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Medical Clinic Discipline, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

⁵Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

⁶Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil

⁷Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

ABSTRACT

Brown spiders have world-wide distribution and are the cause of health problems known as loxoscelism. Necrotic cutaneous lesions surrounding the bites and less intense systemic signs like renal failure, DIC, and hemolysis were observed. We studied molecular mechanism by which recombinant toxin, biochemically characterized as phospholipase-D, causes direct hemolysis (complement independent). Human erythrocytes treated with toxin showed direct hemolysis in a dose-dependent and time-dependent manner, as well as morphological changes in cell size and shape. Erythrocytes from human, rabbit, and sheep were more susceptible than those from horse. Hemolysis was not dependent on ABO group or Rhesus system. Confocal and FACS analyses using antibodies or GFP-phospholipase-D protein showed direct toxin binding to erythrocytes membrane. Moreover, toxin-treated erythrocytes reacted with annexin-V and showed alterations in their lipid raft profile. Divalent ion chelators significantly inhibited hemolysis evoked by phospholipase-D, which has magnesium at the catalytic domain. Chelators were more effective than PMSF (serine-protease inhibitor) that had no effect on hemolysis. By site-directed mutation at catalytic domain (histidine 12 by alanine), hemolysis and morphologic changes of erythrocytes (but not the toxin's ability of membrane binding) were inhibited, supporting that catalytic activity is involved in hemolysis and cellular alterations but not toxin cell binding. The results provide evidence that *L. intermedia* venom phospholipase-D triggers direct human blood cell hemolysis in a catalytic-dependent manner. J. Cell. Biochem. 107: 655–666, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: BROWN SPIDER; VENOM; PHOSPHOLIPASE-D; CATALYSIS; HEMOLYSIS

Medical incidents caused by brown spiders (*Loxosceles* genus) are characterized by skin injuries with urticarial reaction, edema, erythema, and a necrotic lesion that may spread gravitationally as well as systemic manifestations like malaise, weakness, nausea, headache, myalgia, fever, acute renal failure, disseminated intravascular coagulation, and intravascular hemolysis. Systemic reactions may be seen in a minority of cases, but they

can be severe and occasionally fatal in some patients [da Silva et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006].

Several case reports have described intravascular hemolysis following brown spider bites [Williams et al., 1995; de Souza et al., 2008]. On the other hand, many studies have indicated the hemolytic activity upon red blood cells of *Loxosceles* venom under laboratory conditions. It seems that animal species display differential

Grant sponsor: Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná; Grant sponsor: Fundação Araucária-PR; Grant sponsor: CNPq; Grant sponsor: CAPES-Brazil.

*Correspondence to: Silvio S. Veiga, Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná 81531-990, Brazil. E-mail: veigass@ufpr.br

Received 12 November 2008; Accepted 24 February 2009 • DOI 10.1002/jcb.22148 • © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Published online 19 May 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

susceptibility to venom-induced hemolysis. Human and swine erythrocytes are more susceptible to lysis than those from rabbit and guinea pig [Futrell, 1992]. The laboratory features observed in victims may include hemoglobinuria, proteinuria, and bilirubin in the urine [Williams et al., 1995; Lung and Mallory, 2000; de Souza et al., 2008]. Some authors suggest that the nephrotoxicity following brown spider accidents may reflect hematologic disturbances like intravascular hemolysis and disseminated intravascular coagulation, which may lead to renal failure [Futrell, 1992; da Silva et al., 2004]. The *Loxosceles* venom is crystalline and minute in volume (a few microliters). It is enriched in proteic toxins with an electrophoretic protein profile in the regions between 20 and 40 kDa, and venom from both female and male animals triggers noxious effects [Futrell, 1992; da Silva et al., 2004]. The whole venom contains several biochemically well characterized molecules, including hyaluronidases [Barbaro et al., 2005; da Silveira et al., 2007a], astacin-like metalloproteases [Feitosa et al., 1998; da Silveira et al., 2007c], low molecular mass insecticidal peptides [de Castro et al., 2004], and phospholipases- D or named dermonecrotic toxins [Machado et al., 2005; Chaim et al., 2006; da Silveira et al., 2006, 2007b; Kalapothakis et al., 2007; Appel et al., 2008].

The dermonecrotic toxin is the best-known molecule found in different brown spider venom. Several studies identified this toxin as contributing to the major deleterious effects of spider bites, including hemolysis [Forrester et al., 1978], platelet aggregation [Kurpiewski et al., 1981], vessel hyperpermeability [da Silveira et al., 2006], nephrotoxicity [Chaim et al., 2006; Kusma et al., 2008], and typical dermonecrotic lesions [Futrell, 1992; da Silva et al., 2004]. This toxin has been found in the venoms of *Loxosceles reclusa* [Futrell, 1992], *L. gaucho* [Barbaro et al., 1992, 1994], *L. laeta* and *L. intermedia* [Barbaro et al., 1994], *L. rufescens* [Young and Pincus, 2001], and *L. boneti* [Ramos-Cerrillo et al., 2004], supporting its species conservation and biological importance. Previous studies have characterized dermonecrotic toxin as a sphingomyelinase- D molecule based on its ability to hydrolyze sphingomyelin into choline and acylsphingosine phosphate [Futrell, 1992]. Nevertheless, based on additional biochemical analysis, the term sphingomyelinase- D has been replaced by phospholipase- D to represent a more accurate and broader denomination. The toxin hydrolyzes not only sphingomyelin but also lysoglycerophospholipids to generate ceramide 1-phosphate (C1P) or lysophosphatidic acid (LPA) [Lee and Lynch, 2005]. By using current molecular biology and proteomic techniques, it has been demonstrated that the dermonecrotic toxin phospholipase- D is a member of a larger family of related molecules displaying similar molecular masses as well as amino acid, immunological, and biological homologies [Kalapothakis et al., 2007]. Studies corroborate and strengthen the idea of the existence of an intraspecies family of phospholipase- D toxins and suggest that the deleterious activities induced by these toxins reflect a synergistic mechanism for different toxin isoforms found in the whole venom.

The mechanism by which the venom causes hemolysis is currently under investigation. This effect is calcium- and complement-dependent but antibody-independent, and hemolysis is induced by native and recombinant phospholipase- D toxins [Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Ribeiro et al., 2007].

Herein, we compare a recombinant active phospholipase- D [Chaim et al., 2006] and a recombinant phospholipase- D with site-directed mutation in the catalytic domain [Kusma et al., 2008] and report the direct involvement of the catalytic domain of this toxin in hemolytic activity. These results strengthen previous data reporting the participation of dermonecrotic toxins in red blood cell lysis and suggest a direct molecular mechanism dependent on the catalytic activity of phospholipase- D for this event.

MATERIALS AND METHODS

REAGENTS

Polyclonal antibodies to whole venom toxins and phospholipase- D toxin were produced in rabbits as previously described [Luciano et al., 2004; Chaim et al., 2006]. Hyperimmune IgGs were purified from serum using a mixture of Protein-A and Protein-G Sepharose beads (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) as recommended by the manufacturer. Phenylmethylsulfonyl fluoride, EDTA, EGTA, 1,10-phenanthroline, and fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG were purchased from Sigma (St. Louis). Whole venom from *L. intermedia* was extracted from spiders captured from the wild as described by Feitosa et al. [1998].

RECOMBINANT PROTEIN CLONING AND EXPRESSION

The venom gland cDNA library was previously built [Chaim et al., 2006; da Silveira et al., 2006]. The GenBank data deposition information for *L. intermedia* cloned LiRecDT1 cDNA is DQ218155. The cDNA corresponding to the mature phospholipase- D LiRecDT1 protein was amplified by PCR. The forward primer used was 30Rec sense (5'-CTCGAGGCAGGTAATCGTCGGCCTATA-3') and was designed to contain an *Xho* I restriction site (underlined) plus the sequence related to the first seven amino acids of the mature protein. The reverse primer was 30Rec antisense (5'-CGGGATCC-TTATTCTTGAATGTCACCCA-3'), which contains a *Bam*H I restriction site (underlined) and a stop codon (bold). The PCR product was cloned into a pGEM-T vector (Promega, Madison). The pGEM-T vector containing the cDNA encoding the mature protein was then digested with *Xho* I and *Bam*H I restriction enzymes. The excised insert was gel purified using a QIAquick Gel 74 Extraction Kit (Qiagen, Valencia) and subcloned into a pET-14b vector (Novagen, Madison) digested with the same enzymes. The mutated toxin LiRecDT1 H12A was obtained by a Megaprimer PCR method, which was performed with rounds of PCR to introduce a site-directed mutagenesis in the LiRecDT1 sequence [Kusma et al., 2008]. Briefly, the first round introduced the site-directed mutagenesis into the first histidine amino acid residue of the catalytic domain using the reverse primer P1H12A (5'-ATTTACCATGGCCCCATGATC-3'), which was designed to contain the codon substitute for alanine plus the sequence related to the other original amino acids of mature protein. The recombinant protein GFP-LiRecDT1 was obtained by subcloning the previously constructed LiRecDT1 [Chaim et al., 2006] and the sequence of enhanced green fluorescence protein (GFP) into pET-14b using a Blunt-Cut-Cut strategy at *Nde* I site of pET-14b and two *Bam*H I sites (between LiRecDT1, GFP and the vector). The resulting construct was a fusion protein with a 6x His-Tag at the N-terminus, the sequence of mature LiRecDT1, and the sequence of

GFP at the C-terminus. All recombinant constructs (LiRecDT1, LiRecDT1 H12A, GFP-LiRecDT1) were expressed as fusion proteins, with a 6x His-Tag at the N terminus and a 13 amino acid linker (including a thrombin site) between the 6x His-Tag and mature protein (N-terminal amino acid sequence before the mature protein: MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLE). pET-14b/L. *intermedia* cDNA constructs were transformed into One Shot *E. coli* BL21(DE3)pLysS-competent cells (Invitrogen, Carlsbad) and plated on LB agar plates containing 100 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol. A single colony was inoculated into 50 ml LB broth (100 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol) and grown overnight at 37°C. A 10 ml portion of this overnight culture was grown in 1 L LB broth/ampicillin/chloramphenicol at 37°C until the OD at 550 nm reached 0.5. IPTG (isopropyl β-D-thiogalactoside) was added to a final concentration of 0.05 mM, and the culture was induced by incubation for an additional 3.5 h at 30°C (with vigorous shaking). Cells were harvested by centrifugation (4,000g, 7 min), and the pellet was frozen at -20°C overnight.

RECOMBINANT PROTEIN PURIFICATION

Cell suspensions were thawed and additionally disrupted by six cycles of 10 s of sonication at low intensity. Lysed materials were centrifuged (20,000g, 20 min), and the supernatants were incubated with 1 ml Ni²⁺-NTA agarose beads for 1 h at 4°C with gentle agitation. The suspensions were loaded into a column, and the packed gel was exhaustively washed with the appropriate buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) until the OD at 280 nm reached 0.01. Recombinant proteins were eluted with 10 ml of elution buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole), and 1 ml fractions were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions. Fractions were pooled and dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS).

ERYTHROCYTES

Adult rabbits weighing approximately 3 kg from the Central Animal House of the Federal University of Paraná were used for blood collection and erythrocyte preparation. Sheep erythrocytes were purchased from Newprov (Pinhais, Brazil). Horse erythrocytes were obtained from adult animals of Jockey Club (Curitiba, Brazil). Human erythrocytes were obtained from normal donors. All experimental protocols using animals were performed according to the "Principles of laboratory animal care" (NIH Publication no 85-23, revised 1985), "Brazilian Federal Laws," and ethical committee agreement number 245 of the Federal University of Paraná. In the case of humans, the blood collection procedure was authorized by the ethical committee agreement of the Federal University of Paraná.

PREPARATION OF ERYTHROCYTES

After blood was harvested with acid EDTA Na₂ 5% and a 21-gauge needle (BD Plastipak, Franklin Lakes) on the day of each experiment, the platelet-rich plasma and buffy coat were removed by aspiration after centrifugation at 200g for 15 min. Packed erythrocytes were washed three times with Ringer Solution for morphological observations (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 32 mM

HEPES, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, pH 7.4, 300 mOsm/kg H₂O) or Tris buffer Sucrose (TBS) for hemolysis assays (250 mM sucrose, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 280 mOsm/kg H₂O). Washed erythrocytes were resuspended in the appropriate buffer at a concentration of 5 × 10⁸ cells/ml.

DETERMINATION OF HEMOLYTIC ACTIVITY

The hemolysis assay was performed as described by Harris and Phoenix [1997]. Washed red blood cells (10⁸ cells) were added to each Eppendorf tube containing the appropriate concentration of venom/toxin in TBS buffer (serial dilution: 0.025, 0.25, 2.5, and 25 µg/ml). For this assay, samples were performed in pentaplicate along with negative (in presence of the appropriate amount of TBS only) and positive (red blood cells in distilled water and 0.1% (v/v) Triton X-100) controls. After 24 h of incubation with gentle agitation, controls and samples were centrifuged at 4°C (3 min at 200g) and the absorbances of supernatants read immediately at 550 nm (ELISA ELX 800 Auto Reader, Meridian Diagnostics, Inc., USA). Absorbance values were converted to percent hemolysis using the absorbance values of the positive control as 100% lysis. In order to evaluate the time course of hemolysis, a series of experiments was performed with a selected concentration (25 µg/ml) of LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A. The entire assay was carried out with normal TBS and tested against a normal osmolarity control (without toxin) in pentaplicate at five different time periods (0, 4, 8, 16, and 24 h). Supernatants were processed at each time interval as described above.

OBSERVATION USING LIGHT MICROSCOPY

Human erythrocytes were treated with whole venom (5 µg/ml), recombinant toxin LiRecDT1 (5 µg/ml), and recombinant mutated toxin LiRecDT1 H12A (25 µg/ml) for 0, 4, 8, 16, and 24 h, then fixed with 1% glutaraldehyde, prepared as described by Udden [2005], and then their morphology was observed with a light microscope (Leica-DMIL, Wetzlar, Germany). Control cells were incubated with Ringer Solution. Photomicrographs correspond to digital images of cells originally magnified at 400×.

OBSERVATION USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Ultrastructural analysis of erythrocytes was performed according to Chung et al. [2007]. After 8 h of treatment with 5 µg/ml whole venom, 5 µg/ml LiRecDT1 and 25 µg/ml LiRecDT1 H12A, cells were washed with Ringer Solution. Control cells were incubated with only Ringer Solution. Fixation was performed with a 2% glutaraldehyde solution for 1 h at 4°C, and the erythrocytes were attached onto a coverslip coated with poly-L-lysine at room temperature for 30 min. The coverslip was rinsed with Ringer Solution, dried at room temperature, and sputter-coated with gold. Coverslips were observed on a scanning electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

FLOW CYTOMETRY

Human erythrocytes were incubated for 24 h with 25 µg/ml of whole venom, LiRecDT1, and LiRecDT1 H12A (data not shown). The cell suspensions were analyzed for erythrocyte counts and size distributions using a Flow Cytometer (BD FACSCalibur System, NJ). Control cells (with Ringer Solution only) were used for comparison.

Analysis of GFP-LiRecDT1 treatment was also evaluated via flow cytometry. Washed erythrocytes (5×10^6 cells) were incubated with 25 $\mu\text{g/ml}$ of fluorescent recombinant toxin (24 h, 37°C) in a total volume of 400 μl of Ringer Solution. The samples were then diluted to 1 ml in Ringer Solution, and light scatter and fluorescence channels were analyzed. Background fluorescence (cell and buffer) and non-specific binding of GFP to erythrocytes were evaluated, and acquisition was gated considering these data.

PHOSPHATIDYLSERINE EXPOSURE

Annexin-V-FITC (Invitrogen) binding experiments were performed as described by Wood et al. [1996] using a flow cytometer (BD FACSCalibur System). Human erythrocytes were incubated for 4 h with 25 $\mu\text{g/ml}$ of whole venom, LiRecDT1, and LiRecDT1 H12A (data not shown). Control cells were treated with Ringer Solution only. Erythrocytes were diluted (5×10^6 cells) to a final volume of 0.5 ml in an annexin-V binding buffer, pH 7.4 (containing 10 mM HEPES, 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM NaH_2PO_4 , 5 mM glucose, 5 mg/ml BSA, and 2.5 mM CaCl_2). Annexin-V-FITC was added to a concentration of 0.1 μM to the red blood cells, and samples were incubated for 15 min at room temperature in the dark. After incubation, an aliquot of the sample was taken for flow cytometric analysis. Cells were analyzed by forward scatter, and Annexin-V fluorescence intensity was measured in fluorescence channel with an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 530 nm. The percentage of Annexin-V positive cells and their mean fluorescence intensity (in arbitrary units) were calculated using CellQuest Pro software for Macintosh. Data from 100,000 events were collected and analyzed.

CONFOCAL IMMUNOFLUORESCENCE

Peripheral blood (1 ml) was washed and diluted in Ringer Solution containing 10 mM glucose and 1 mg/ml BSA, pH 7.4. BSA was used in order to preserve the biconcave shape of normal erythrocytes. This assay was performed according to Kalfa et al. [2006]. Erythrocytes were incubated with whole venom, LiRecDT1, and LiRecDT1 H12A for 8 h (25 $\mu\text{g/ml}$), and 100 μl of the cell suspension was applied onto a poly-L-lysine coated coverslip for adhesion. This procedure allows cells to be treated while attached to coverslips, thereby minimizing modification of the cell shape from repeated centrifugations. Unbound cells were removed by washing with Ringer Solution, and adherent blood cells were fixed on coverslips with 0.1% glutaraldehyde in Ringer Solution (10 mM glucose, 1 mg/ml BSA, pH 7.4) for 10 min at 4°C. To ensure complete neutralization of background unspecific fluorescence, cells were then incubated in block solution buffer (Ringer Solution containing 10 mM glucose and 1 mg/ml BSA, 0.1 M glycine, 5% serum fetal bovine, and 0.05% sodium azide) at room temperature for 1 h. The samples were stained for toxins using indirect immunofluorescence with antibodies at a 1:1,000 dilution (anti-venom and anti-LiRecDT1) and incubated for 2 h. After washing with buffer, slides were incubated for 1 h with secondary FITC-conjugated anti-rabbit IgG (1:250). Coverslips were mounted on glass slides using Fluoromount-G (Southern Biotechnology, Birmingham). Samples were observed using the confocal fluorescence microscope (Confocal Radianc 2,100, BioRad, Hercules) coupled to a Nikon-Eclipse E800 with Plan-Apochromatic

objectives (Sciences and Technologies Group Instruments Division, Melville, USA).

LIPID RAFT ANALYSIS OF TOXIN-TREATED ERYTHROCYTES

For localization of lipid rafts on the erythrocyte cell surface, the Vybrant Alexa-Fluor 594 Lipid Raft Labeling Kit was used as recommended by the manufacturer (Invitrogen). Briefly, red blood cells treated with (25 $\mu\text{g/ml}$) whole venom and recombinant toxins for 8 h at 37°C or control cells (absence of toxins) were incubated with Cholera toxin subunit B (CT-B) (conjugate Alexa 594) for 10 min at 4°C. The cells were then gently washed three times with chilled Ringer Solution containing 10 mM glucose and 1 mg/ml BSA, pH 7.4. Crosslinking of CT-B labeled lipid rafts was performed with chilled anti-CT-B antibody (1:200 dilution) for 15 min at 4°C. Cells were washed, fixed, and blocked as described above for immunofluorescence. The samples were visualized using a fluorescence confocal microscope (Confocal Radianc 2100, BioRad) coupled to a Nikon-Eclipse E800 with Plan-Apochromatic objectives (Sciences and Technologies Group Instruments Division).

EFFECT OF ENZYMATIC INHIBITORS

The recombinant toxin LiRecDT1 (25 $\mu\text{g/ml}$) was incubated for 30 min at 4°C with 1 mM EDTA, or 1 mM EGTA, or 1 mM 1,10-phenanthroline, or 1 mM PMSF. Washed erythrocytes were added and incubated for 24 h at 37°C with gentle agitation. Also a control group without toxin (TBS only) was examined. Supernatants were read at each time interval as previously described in Determination of Hemolytic Activity Section.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses of hemolytic assays were performed using analyses of variance (ANOVAs) and the Tukey test for average comparisons via GraphPad InStat program version 3.06 for Windows. Mean \pm SEM values were used. Significance was determined as $P \leq 0.05$.

RESULTS

DIRECT HEMOLYSIS INDUCED BY RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE-D FROM BROWN SPIDER VENOM

Brown spider venom induces hemolysis in patients and experimental animal models exposed to the venom. Venom activity is attributed to native dermonecrotic toxins that can reproduce this effect in a serum complement-dependent manner when purified from whole venom [Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006]. Herein, we provide additional data suggesting direct hemolysis activity caused by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) expressed as a recombinant toxin from a cDNA library of the *L. intermedia* venom gland [Chaim et al., 2006]. Figure 1A depicts hemolysis of human red blood cells incubated in serum-free medium with different concentrations of toxin at 37°C. As observed, hemolysis is present in a dose-dependent manner. Additionally, Figure 1B shows experiments performed after different times of exposure to the recombinant toxin. Hemolysis is evident in a time-dependent manner. As shown, the above-mentioned results

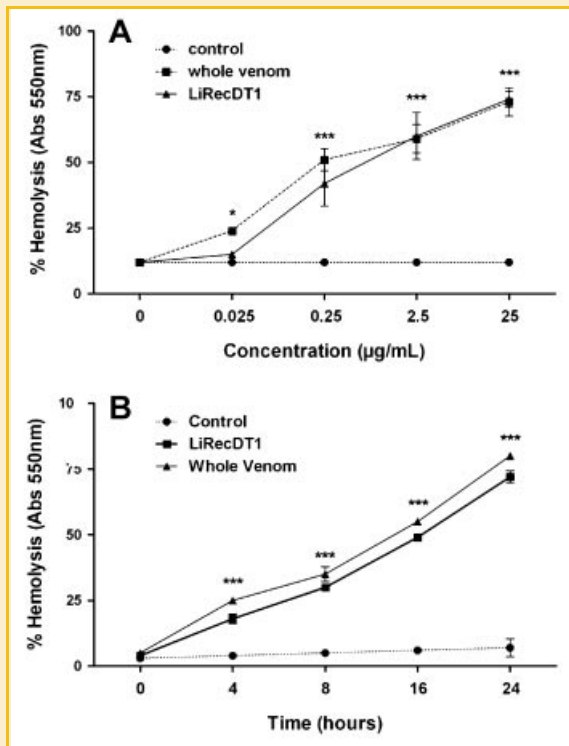


Fig. 1. Recombinant phospholipase-D from brown spider venom induces direct hemolysis in human erythrocytes. A: Human erythrocytes suspended in TBS were incubated with different concentrations of *L. intermedia* whole venom, with a LiRecDT1, or in the absence of venom toxins (negative control), for 24 h at 37°C. B: Erythrocytes were incubated with 25 µg/ml of whole venom, with LiRecDT1, or in the absence of toxins (negative control) over five different time periods (0, 4, 8, 16, and 24 h). The absorbances of supernatants were read at 550 nm, and the percentage of hemolysis was determined using the absorbance values induced by distilled water as 100% of hemolysis (positive control). Results represent averages of five experiments ± SEM. * $P \leq 0.05$ or *** $P \leq 0.001$.

support the direct hemolytic activity of phospholipase-D toxin on human erythrocytes.

MORPHOLOGICAL ALTERATIONS OF HUMAN ERYTHROCYTES INDUCED BY RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE-D

To ascertain cytotoxicity and the direct hemolytic effect evoked by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from *Loxosceles* spider venom as described above, human erythrocytes were exposed to recombinant toxin for different times and then analyzed via an inverted microscope. As depicted in Figure 2A, morphological changes were present in erythrocytes exposed to toxin but not the negative control. These findings included mainly alterations in cell size and shape in a concentration- and time-dependent manner. Poikilocytosis of erythrocytes treated with toxin included a change from biconcave disks flattened and depressed in the center (control group) to spherical and rounded cells. Additionally, erythrocytes exposed to the toxin were scanned by electron microscopy for changes. Figure 2B illustrates the alterations detected. Toxin treatment of erythrocytes led to the appearance of spherocyte,

stomatocyte, and knizocyte forms, which were accompanied by a cell size decrease in a time-dependent manner. Finally, erythrocytes were examined by flow cytometry showing FSC ("forward scatter") and SSC ("side scatter") after 24 h of incubation with 25 µg/ml of recombinant toxin. As depicted in Figure 2C, toxin treatment induced cell lysis and debris formation and thus strengthened our hypothesis of direct toxin hemolytic activity.

THE DIRECT LYSIS OF ERYTHROCYTES CAUSED BY PHOSPHOLIPASE-D DEPENDS ON THE ANIMAL SPECIES EVALUATED

With the objective of corroborating the above-described results, we next analyzed the direct hemolytic activity of recombinant phospholipase-D on washed red blood cells from different animal species. Washed erythrocytes from human, rabbit, sheep, and horse were exposed to purified recombinant phospholipase-D and studied for lysis. As depicted in Figure 3, erythrocytes from different animal species did not suffer phospholipase-induced hemolysis in a similar manner. It seems that there is differential susceptibility of red blood cells to the enzyme. Additionally, human erythrocytes from donors classified as A, B, or O blood groups as well as Rh (+) or Rh (-) were exposed to recombinant toxin and evaluated for hemolysis. Hemolysis induced by phospholipase-D was not dependent on either ABO group antigens or the Rhesus system. Erythrocytes from all blood groups tested suffered a similar percentage of hemolysis; supporting the idea that hemolysis triggered by brown spider venom phospholipase-D was not dependent on factors linked to ABO markers or the Rhesus system (data not shown). Erythrocytes from sheep, human, and rabbit were more easily lysed than cells from horse, which were apparently more resistant to lysis. These data confirmed the above-described results that phospholipase-D is capable of direct lysis of erythrocytes and suggested the possibility that membrane constituents may play a role in venom phospholipase-D activity, because cytoplasmic membranes from erythrocytes of different species have differences in lipid composition.

EVIDENCE THAT RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE-D BINDS TO THE HUMAN RED BLOOD CELL MEMBRANE

We intended to demonstrate that there are sites of attachment of phospholipase-D on the erythrocyte membrane. Since the enzyme is also a sphingomyelinase and can thus putatively bind to sphingomyelin (a phospholipid constituent of the outer erythrocyte membrane), we investigated human erythrocytes treated with phospholipase-D by an immunofluorescence reaction using an antibody that reacts with phospholipase-D. As shown in Figure 4A, the antibody reaction produced a positive signal in erythrocytes. Additionally, washed erythrocytes were incubated with a recombinant fusion toxin GFP-LiRecDT1 using GFP as a negative control. Cells were evaluated by flow cytometry. As depicted in Figure 4B, recombinant fusion toxin bound to erythrocytes whereas signal for GFP alone was negative. Additionally, human erythrocytes were treated with GFP-LiRecDT1 and visualized by confocal microscopy (Fig. 4C). Our results support the direct binding of phospholipase-D to the membrane of human erythrocytes and suggest the possible enzyme catalytic domain-dependent manner of hemolysis.

TOXIN BINDING ON THE ERYTHROCYTE SURFACE STIMULATES CYTOPLASMIC MEMBRANE LIPID REORGANIZATION

Once we detected the binding of the toxin to the surface of erythrocytes, we next analyzed the direct activity of phospholipase-D toxin on the lipid organization of the cytoplasmic membrane. For this purpose, washed erythrocytes treated with recombinant toxin were incubated with annexin-V and analyzed by flow cytometry. As evidenced by Figure 5A, erythrocytes following toxin treatment were positive for the binding of annexin-V. This finding suggests the exposure of negatively charged phosphatidylserine at the cell surface as well as the reorganization of membrane lipid components. Moreover, venom phospholipase-D-treated erythrocytes were incubated with Cholera toxin B subunit (a lipid raft marker) and evaluated through confocal microscopy. As shown by Figure 5B, our results evidence a reorganization of rafts following phospholipase-D toxin exposure. Exposure to this toxin apparently induces an aggregation of the lipid rafts.

THE CATALYTIC ACTIVITY OF PHOSPHOLIPASE-D PLAYS A ROLE IN HEMOLYSIS

To ascertain the mechanism by which phospholipase-D (dermonecrotic toxin) of *Loxosceles* spider venom triggers its noxious effects on erythrocytes and further to analyze the involvement of this enzyme's catalytic activity (which is dependent on magnesium ion coordination at the catalytic site) [Murakami et al., 2005]. Human erythrocytes were exposed to recombinant toxin in the presence of inhibitors like phenylmethylsulfonyl fluoride, 1,10-phenanthroline, EDTA, and EGTA and then analyzed for hemolysis. As depicted in Figure 6A, all three divalent ion chelators (EGTA, EDTA, and 1,10-phenanthroline) significantly inhibited hemolysis evoked by phospholipase-D. These findings contrast with those from phenylmethylsulfonyl fluoride treatment, a serine protease inhibitor that had no effect on hemolysis. EDTA has a higher affinity for magnesium ions and inhibited hemolysis more efficiently than other divalent metal chelators. Additionally, we incubated human

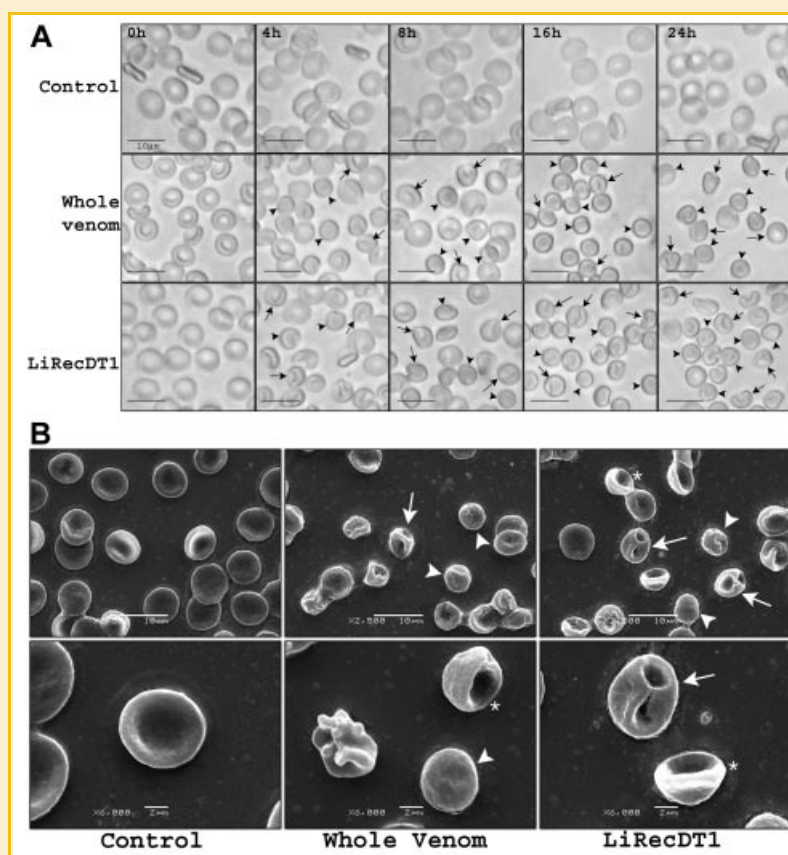


Fig. 2. Recombinant phospholipase-D treatment of human erythrocytes causes morphological alterations of cells. A: Human erythrocytes suspended in Ringer Solution were incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of *L. intermedia* whole venom, with LiRecDT1, or in the absence of toxins (control) for different times (0, 4, 8, 16, and 24 h) and then observed with an inverted microscope. Morphological changes of erythrocytes were observed in a time-dependent manner. Changes included the appearance of spherical and rounded cells (arrows point to stomatocytes-like cells and arrowheads show spherocytes-like cells); these contrasted with control cells that were biconcave disks flattened and depressed in the center. B: Additionally, cells were also observed by scanning electron microscopy. Venom or LiRecDT1 treatments of erythrocytes led to the appearance of spherocytes (arrowheads), stomatocytes (asterisks), and knizocytes (arrow) as well as a decrease in cell size. Scale bars are shown at the left of the figures. C: Washed erythrocytes were exposed to whole venom or LiRecDT1 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and (after 24 h of exposure) analyzed by flow cytometry to measure cell size and internal complexity through forward angle (FSC) and 90° side angle (SSC) light scatters. Two gates were created in the dot plots to distinguish intact cells (right gate) from lysed cells or debris (left gate). The number of cells with decreased size, number of lysed cells, or amount of debris visibly increased following venom or toxin treatment. Control cells were analyzed in the absence of toxins. The figure shows one representative from three trials.

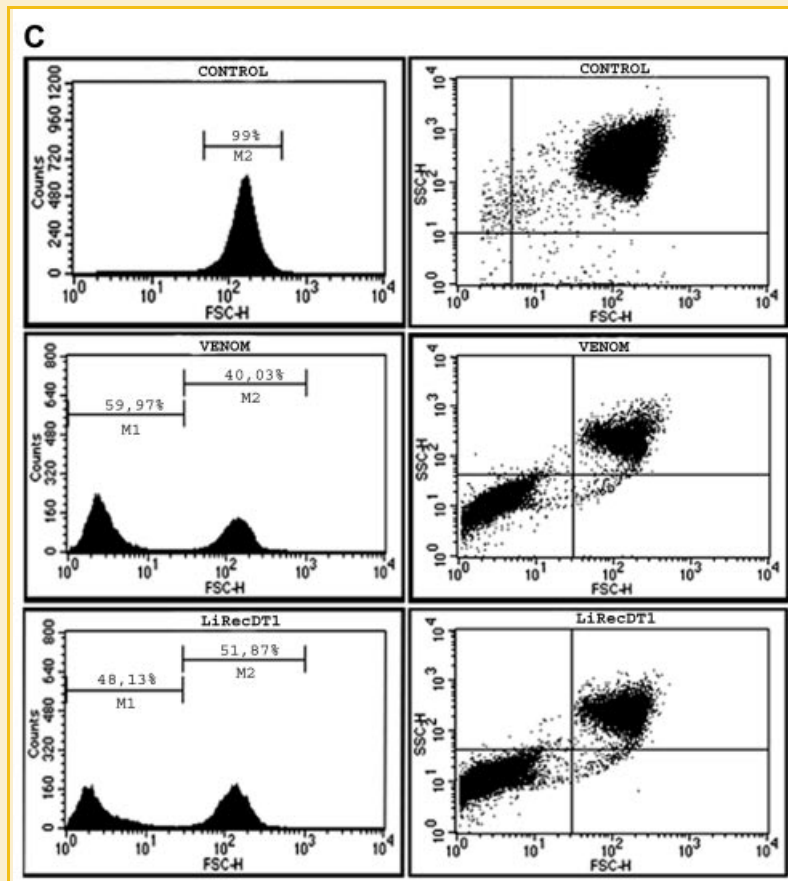


Fig. 2. (Continued)

erythrocytes in the presence of recombinant toxin (wild-type) or a mutated isoform in which we used site-directed mutagenesis at the catalytic domain to substitute a histidine residue at position 12 for an alanine residue (LiRecDT1 H12A) [Kusma et al., 2008]. As shown in Figure 6B, the mutated toxin did not cause significant hemolysis

compared to the wild-type molecule. Additionally, it did not induce morphological changes in washed erythrocytes and despite its ability to bind to them. These findings strengthen the hypothesis that directed phospholipase- α hemolytic activity is dependent on the catalytic activity of the toxin.

DISCUSSION

Experimental studies with animal venoms have been observed that hemostatic disturbances, such as hemolytic and hemorrhagic events, are frequently associated with enzymatic activity of venom constituents. The serum complement system has long been described to participate in the hemolysis induced by brown spider venom. It seems that spider envenomation induces the activation of an alternative complement pathway that facilitates complement-mediated hemolysis [Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006].

The hemolytic effect induced by *Loxosceles* spider venom is demonstrated based on the clinical and laboratory features observed in accident victims. These features include elevated creatine kinase levels, hematuria, hemoglobinuria, proteinuria, and shock [Williams et al., 1995; Lung and Mallory, 2000; França et al., 2002]. Additionally, nephrotoxicity is supported by animal experimental

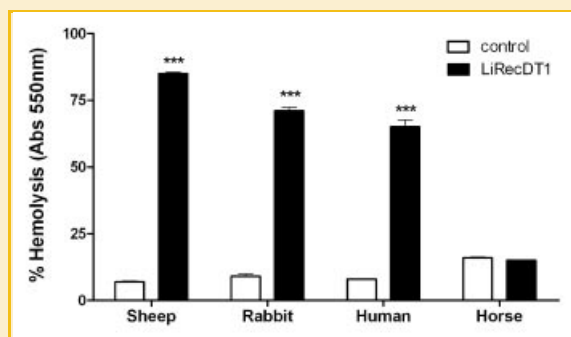


Fig. 3. Hemolysis caused by brown spider recombinant phospholipase- α depends on the animal species evaluated. Washed erythrocytes from sheep, rabbit, human, and horse were suspended in TBS, exposed to 25 μ g/ml of LiRecDT1 for 24 h at 37°C, and evaluated for hemolysis. Results represent averages of five experiments \pm SEM. *** $P \leq 0.001$.

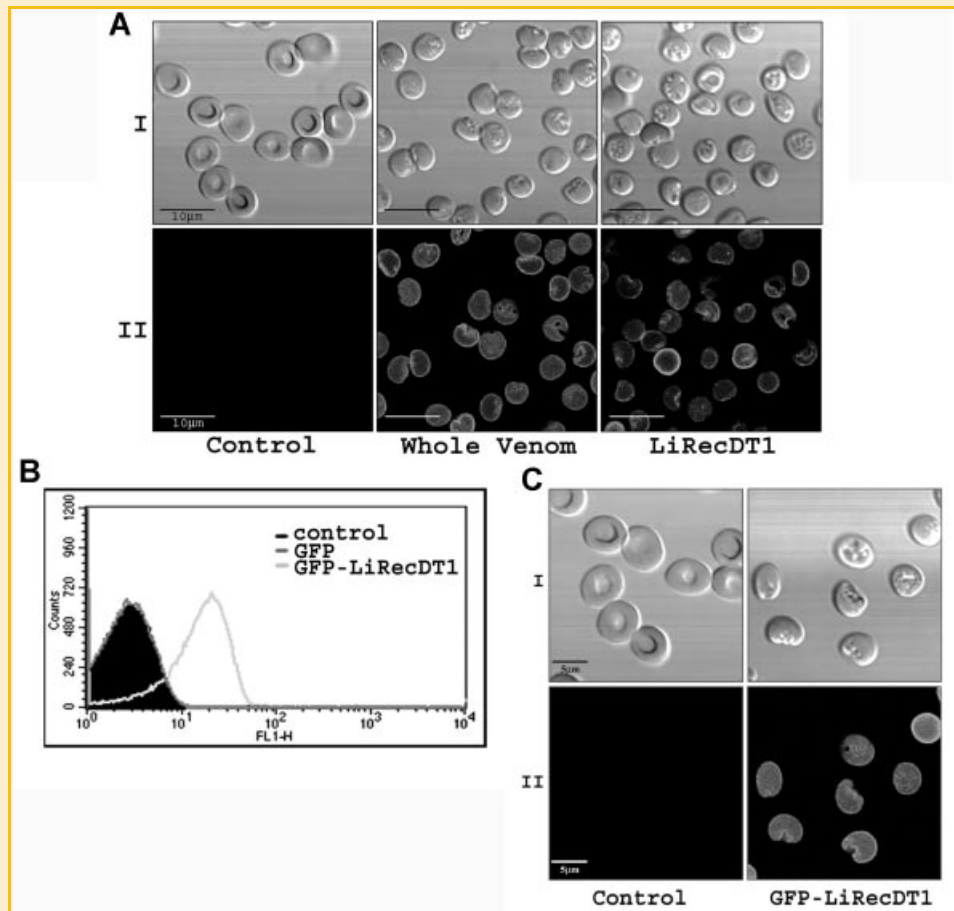


Fig. 4. Brown spider venom recombinant phospholipase-D binds to the human red blood cell membrane. A: Confocal microscopy was used to analyze human erythrocytes following (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) whole venom or LiRecDT1 exposure for 8 h at 37°C. Cells were immunostained with antibodies against LiRecDT1. For a negative control, cells were processed identically in the absence of toxin treatments. (I) Cells observed by Differential Interference Contrast (DIC), (II) Cells analyzed through immunofluorescence. B: Human erythrocytes were exposed under conditions identical to those described above to a recombinant fusion toxin GFP-LiRecDT1, purified GFP alone, or the absence of treatments (negative control) and analyzed by cell cytometry. Our results suggest the specific binding of the fusion protein to erythrocytes. C: Human erythrocytes were treated with a recombinant fusion toxin GFP-LiRecDT1, and negative control cells were not exposed to venom toxins. Cells were observed by confocal microscopy. Scale bars are shown at the left of the figure.

protocols. Animal models confirmed clinical data from accident patients by showing renal lesions following venom exposure [Luciano et al., 2004] and a direct nephrotoxicity evoked by the dermonecrotic (phospholipase-D) toxin [Chaim et al., 2006].

Previous studies have characterized dermonecrotic toxin as a sphingomyelinase-D molecule based on its activity to hydrolyze phospholipid sphingomyelin into choline and acylsphingosine-phosphate [Futrell, 1992]. By hydrolyzing phospholipids that generate ceramide 1-phosphate or lysophosphatidic acid, it is postulated that dermonecrotic toxin activates signaling pathways in different cells and causes pathophysiological changes like the inflammatory response, platelet aggregation, and increased blood vessel permeability [Anliker and Chun, 2004; Moolenaar et al., 2004; Tokumura, 2004; Lee and Lynch, 2005].

In this study, we used two recombinant isoforms of the phospholipase-D toxin from *L. intermedia* venom gland: a wild-type molecule and a molecule with a single amino acid mutation (H12A) at the catalytic site of the toxin [Murakami et al., 2005,

2006]. Our experimental data support the direct involvement of phospholipase-D activity in the hemolytic activity evoked by brown spider venom. Our first results demonstrated a direct hemolytic effect of wild-type recombinant phospholipase-D on human erythrocytes. Toxin-dependent hemolysis occurs in a concentration- and time-dependent manner, supporting the specificity of the reaction. Toxin cytotoxicity was additionally confirmed by changes of erythrocytes over time following toxin exposure; such changes were observed by inverted microscopy, scanning electron microscopy, and cell cytometry and included poikilocytosis and anisocytosis. Moreover, the hemolysis observed after exposure of human red blood cells to the toxin is not dependent on the ABO or Rhesus systems, since washed erythrocytes from groups A, B, and O as well as Rh positive and negative samples were lysed in a similar way following toxin treatment (data not shown). These findings support the hypothesis that this reaction did not depend on blood group compatibility. Nevertheless, direct hemolysis is dependent on animal species, since human, sheep, and rabbit erythrocytes were

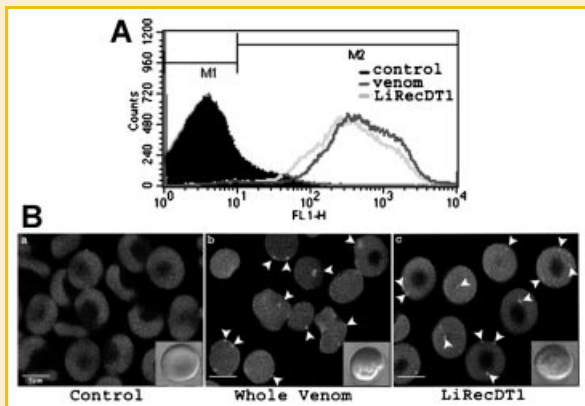


Fig. 5. Brown spider recombinant phospholipase-D binding to the erythrocyte surface stimulates cytoplasmic membrane lipid reorganization. A: Human erythrocytes suspended in Ringer solution were incubated for 4 h with 25 μ g/ml of LiRecDT1. For a negative control, cells were maintained only with Ringer Solution. Following treatments, cells were incubated with annexin-V-FITC and analyzed through cell cytometry. The results indicate the binding of annexin-V and exposure of phosphatidylserine at the cell surface after whole venom and LiRecDT1 treatments. B: Also, lipid rafts were visualized through confocal microscopy with Cholera toxin subunit B-Alexa-Fluor 594 and anti-Cholera toxin subunit B rabbit serum. Arrowheads indicate for reorganization in the distribution of lipid rafts on the erythrocyte cell surface, as observed by aggregates of membranes. On the bottom of figures are shown details of the DIC cell analyses (*). The scale bar is shown at the left of the figure.

lysed but erythrocytes from horse were less severely lysed after toxin treatment. These results suggest that cell surface constituents regulate the susceptibility of erythrocytes to phospholipase-D lysis, since erythrocytes from different animal species have differing compositions of the extracellular lipoprotein monolayer. Interestingly, the concentration of sphingomyelin (a putative substrate for venom phospholipase-D) differs in the erythrocytes of these four tested animals. Lipid analyses of red blood cells reported 19.5% of sphingomyelin to human cells [Ingraham et al., 1981], 50% to sheep [Ochi et al., 2004], and 20% to rabbit [Ochi et al., 2003]. Erythrocytes in these animals were more susceptible to phospholipase-dependent lysis than those in horse, which has 14% of sphingomyelin [Ochi et al., 2003].

Through confocal immunofluorescence microscopy using antibodies to phospholipase-D toxin [da Silveira et al., 2006], we were able to detect an interaction of the toxin with the human erythrocyte cell surface. This result demonstrates the existence of sites of attachment for phospholipase toxin on human erythrocyte cell membranes and supports the hypothesis that the morphological and structural changes, as well as hemolysis induced by the toxin, occur as a result of toxin binding to erythrocyte membranes as an early step of process. Additionally, the interaction of venom phospholipase-D with erythrocyte cell membranes was supported by changes in the phospholipid content, as shown by the binding of annexin-V following toxin treatment. This finding indicates the exposure of phosphatidylserine, a negatively charged and inner monolayer molecule that translocates to the outer surface of the erythrocyte after phospholipase-D exposure. Phosphatidylserine exposure at the

cell surface can induce several physiopathologic consequences including enhancement of coagulative reactions, recognition of apoptotic cells by phagocytes and blood cell attachment to endothelium [Closse et al., 1999]. Toxin binding also causes lipid plasma membrane reorganization, as visualized by Cholera toxin B binding. It has previously been shown that increases in ceramide levels following sphingomyelinase activation are one of the mechanisms that promote PS exposure in erythrocytes [Lang et al., 2005].

We next evaluated the effects of protein inhibitor molecules on toxin-dependent hemolysis and identified that divalent metal chelators like EDTA, EGTA, and 1,10-phenanthroline efficiently inhibited human blood cell lysis. However, the serine protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride did not block erythrocyte lysis. These results support the idea that a divalent metal ion is necessary for the biological activity of toxin in hemolysis. They are in agreement with literature data suggesting that phospholipase-D from brown spider venom contains a magnesium coordination site that plays an essential role in enzyme catalysis as a catalytic domain [Murakami et al., 2005, 2006]. This is interesting since EDTA, which has the greatest affinity for magnesium ions relative to the other tested chelators, was more efficient in hemolysis inhibition. Together, the above findings suggest that the catalytic activity of phospholipase-D plays an essential role in the direct hemolysis induced by this toxin. Experimental cell lysis has been shown to be related with phospholipase A₂ activity from *Bothrops jararacussu* snake venom [Soares et al., 2002].

The involvement of the catalytic site of venom phospholipase-D toxin in hemolysis was finally proved using a site-directed mutated isoform of phospholipase-D. In the catalytic domain of this isoform, a histidine (a basic and positively charged amino acid) residue at position 12 was replaced by a residue of alanine (non-polar amino acid) [da Silveira et al., 2006; Murakami et al., 2006]. Human red blood cells treated with the mutated toxin (even at concentrations higher than those used for the wild-type molecule) over time showed no hemolysis. Likewise, the mutation of the toxin also blocked the sphingomyelinase-D activity of this enzyme, demonstrating that sphingomyelin molecules on the cell surface of erythrocytes are involved in the lysis of cells. Additionally, these findings confirm the involvement of the catalytic domain in phospholipase activity that plays a role in direct hemolysis. The evidence shown here indicates that LiRecDT1 H12A can interact with the erythrocyte membrane, but this does not result in morphological changes. These findings are in agreement with our previous results from biopsies of kidney and renal cells [Kusma et al., 2008]. They strongly suggest that the catalytic activity of this enzyme, and not its interaction with the cell membrane, is essential for the hemolytic effects observed here. Treatment of erythrocytes with mutated toxin does not change the lipid organization, as visualized by annexin-V and Cholera toxin B binding (data not shown).

What is the mechanism by which phospholipase-D toxins from brown spider venom cause the direct hemolysis of cells? We postulate that the direct correlation between phospholipase-D activity and hemolysis is due to the fact that brown spider venom phospholipases can generate ceramide 1-phosphate, which is known to induce pathological responses like inflammation and platelet

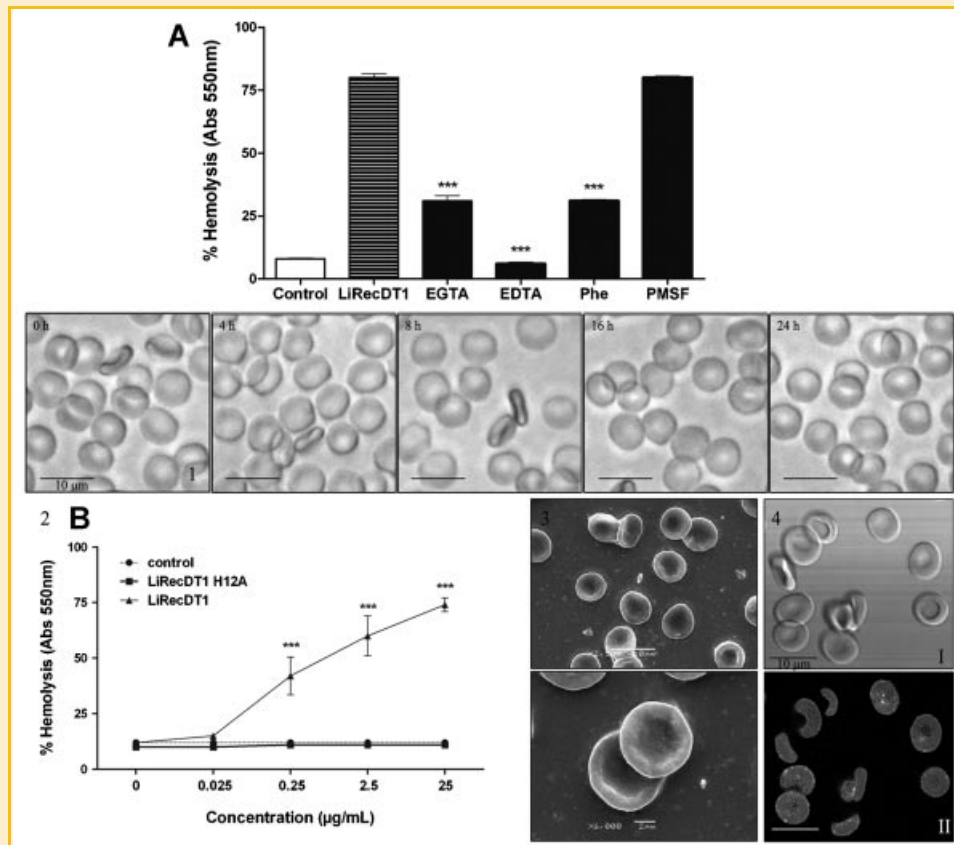


Fig. 6. Brown spider venom phospholipase-D catalysis plays a role in blood cell lysis. A: LiRecDT1 (25 µg/ml) was incubated with either EGTA, EDTA, 1,10-phenanthroline, or PMSF or alone for 30 min. Additionally, washed human erythrocytes suspended in TBS were exposed to LiRecDT1 and inhibitors for 24 h at 37°C and evaluated for hemolysis. Controls for hemolysis were performed using washed erythrocytes without toxin. B: (1) Human erythrocytes suspended in Ringer solution were visualized at light inverted microscope post-incubation with 25 µg/ml of site-directed mutated isoform of recombinant phospholipase-D H12A (LiRecDT1 H12A) for different times (0, 4, 8, 16, and 24 h). (2) Human erythrocytes were suspended in TBS and incubated with LiRecDT1 H12A for 24 h at 37°C. Hemolysis percentage was determined as described in Materials and Methods Section. (3) Cells were then observed with a scanning electron microscopy 8 h following toxin exposure. No morphological changes of erythrocytes were seen following treatment with the LiRecDT1 H12A even at the later assay times. (4) Confocal immunofluorescence microscopy was used to analyze human erythrocytes following of LiRecDT1 H12A exposure for 8 h at 37°C. Cells were immunostained with antibodies against LiRecDT1. (I) Cells observed by DIC. (II) Cells analyzed by immunofluorescence. Scale bars are shown at the left of the figure.

aggregation [Anliker and Chun, 2004; Moolenaar et al., 2004; Lee and Lynch, 2005].

Thus, by generating lipid mediators from red blood cells, venom phospholipase-D stimulates structural changes of the cytoplasmic membrane (such as the exposure of negatively charged phospholipids like phosphatidylserine). This then renders cell membranes more susceptible to physiological stress and finally contributes to hemolysis. In addition, the lipid mediators generated by the action of venom phospholipase-D on cell membranes can directly bind to human red cell membranes. Thus this toxin causes noxious effects in cells that finally evoke lysis. *Clostridium perfringens* α -toxin, which exhibits phospholipase-C (PLC) and sphingomyelinase (SMase) activities, has already been studied as a hemolytic agent [Sakurai et al., 2004]. PLC induces the hemolysis of sheep erythrocytes, and this activity is linked to the activation of sphingomyelin metabolism and the formation of sphingosine 1-phosphate [Ochi et al., 2004]. It was recently shown that hemolysis caused by α -toxin requires the participation of an endogenous sphingomyelinase [Oda et al., 2008].

Many of the morphological alterations observed herein (e.g., shrinkage, membrane blebbing, and phosphatidylserine exposure at the outer membrane leaflet) are characteristic of suicidal death of erythrocytes (eryptosis) [Lang et al., 2005]. One of the established signaling pathways that converge to trigger eryptosis involves phospholipase A₂-mediated release of platelet-activating factor, which activates a sphingomyelinase and leads to the formation of ceramide. The enhanced ceramide levels associated with increased cytosolic Ca²⁺ lead to membrane scrambling and subsequent phosphatidylserine exposure [Lang et al., 2007]. We can postulate that ceramide resulting from venom/toxin activity on erythrocyte membrane sphingomyelin leads to phosphatidylserine exposure. This suggestion is supported by recent work that shows the vertical movement of ceramide from the outer to the inner leaflet membrane. This ceramide was generated using an exogenous bacterial sphingomyelinase that hydrolyzes sphingomyelin at the cell surface [Mitsutake and Igarashi, 2007].

Based on the above results, we cannot rule out the possibility that the serum complement system plays a role in the hemolytic activity

of brown spider venom phospholipase-D, as previously suggested by literature data [Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Swanson and Vetter, 2006]. Instead of this, however, it is rational to speculate that the direct hemolytic effect induced by phospholipase together with complement-dependent hemolysis represent a synergism for the same noxious event described following accidents with brown spiders.

The data described herein indicate that the catalytic activity of phospholipase-D from brown spider venom plays a role in the direct hemolytic activity of this toxin, and they therefore provide insights into loxoscelism and contribute to the possibility of therapy based on the inhibition of phospholipase toxin catalysis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, CNPq, and CAPES-Brazil.

REFERENCES

- Anliker B, Chun J. 2004. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 279:20555–20558.
- Appel MH, da Silveira RB, Chaim OM, Paludo KS, Silva DT, Chaves DM, da Silva PH, Mangili OC, Senff-Ribeiro A, Gremski W, Nader HB, Veiga SS. 2008. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim Biophys Acta* 1780:167–178.
- Barbaro KC, Cardoso JL, Eickstedt VR, Mota I. 1992. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon* 30:331–338.
- Barbaro KC, Eickstedt VR, Mota I. 1994. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *Toxicon* 32:113–120.
- Barbaro KC, Knysak I, Martins R, Hogan C, Winkel K. 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45:489–499.
- Chaim OM, Sade YB, da Silveira RB, Toma L, Kalapothakis E, Chavez-Olortegui C, Mangili OC, Gremski W, von Dietrich CP, Nader HB, Sanches Veiga S. 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 211:64–77.
- Chung SM, Bae ON, Lim KM, Noh JY, Lee MY, Jung YS, Chung JH. 2007. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:414–421.
- Closse C, Dachary-Prigent J, Boisseau MR. 1999. Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium. *Br J Haematol* 107:300–302.
- da Silva PH, da Silveira RB, Appel MH, Mangili OC, Gremski W, Veiga SS. 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* 44:693–709.
- da Silveira RB, Pigozzo RB, Chaim OM, Appel MH, Dreyfuss JL, Toma L, Mangili OC, Gremski W, Dietrich CP, Nader HB, Veiga SS. 2006. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie* 88:1241–1253.
- da Silveira RB, Chaim OM, Mangili OC, Gremski W, Dietrich CP, Nader HB, Veiga SS. 2007a. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* 49:758–768.
- da Silveira RB, Pigozzo RB, Chaim OM, Appel MH, Silva DT, Dreyfuss JL, Toma L, Dietrich CP, Nader HB, Veiga SS, Gremski W. 2007b. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. *Biochimie* 89:289–300.
- da Silveira RB, Wille AC, Chaim OM, Appel MH, Silva DT, Franco CR, Toma L, Mangili OC, Gremski W, Dietrich CP, Nader HB, Veiga SS. 2007c. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem J* 406:355–363.
- de Castro CS, Silvestre FG, Araujo SC, Gabriel de MY, Mangili OC, Cruz I, Chavez-Olortegui C, Kalapothakis E. 2004. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* 44:273–280.
- de Souza AL, Malaque CM, Sztajn bok J, Romano CC, Duarte AJ, Seguro AC. 2008. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. *Toxicon* 51:151–156.
- Feitosa L, Gremski W, Veiga SS, Elias MC, Graner E, Mangili OC, Brentani RR. 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36:1039–1051.
- Forrester LJ, Barrett JT, Campbell BJ. 1978. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: The role of sphingomyelinase D. *Arch Biochem Biophys* 187:355–365.
- França FO, Barbaro KC, Abdulkader RC. 2002. Rhabdomyolysis in presumed viscero-cutaneous loxoscelism: Report of two cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96:287–290.
- Futrell JM. 1992. Loxoscelism. *Am J Med Sci* 304:261–267.
- Harris F, Phoenix DA. 1997. An investigation into the ability of C-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 to undergo membrane interaction. *Biochimie* 79:171–174.
- Ingraham LM, Burns CP, Boxer LA, Baehner RL, Haak RA. 1981. Fluidity properties and liquid composition of erythrocyte membranes in Chediak-Higashi syndrome. *J Cell Biol* 89:510–516.
- Kalapothakis E, Chatzaki M, Goncalves-Dornelas H, de Castro CS, Silvestre FG, Laborne FV, de Moura JF, Veiga SS, Chavez-Olortegui C, Granier C, Barbaro KC. 2007. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. *Toxicon* 50:938–946.
- Kalfa TA, Pushkaran S, Mohandas N, Hartwig JH, Fowler VM, Johnson JF, Joiner CH, Williams DA, Zheng Y. 2006. Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton. *Blood* 108:3637–3645.
- Kurpiewski G, Forrester LJ, Barrett JT, Campbell BJ. 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim Biophys Acta* 678:467–476.
- Kusma J, Chaim OM, Wille AC, Ferrer VP, Sade YB, Donatti L, Gremski W, Mangili OC, Veiga SS. 2008. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie* 90:1722–1736.
- Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wiedert T, Huber SM, Lang F. 2005. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 15:195–202.
- Lang F, Huber SM, Szabo I, Gulbins E. 2007. Plasma membrane ion channels in suicidal cell death. *Arch Biochem Biophys* 462:189–194.
- Lee S, Lynch KR. 2005. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem J* 391:317–323.
- Luciano MN, da Silva PH, Chaim OM, dos Santos VL, Franco CR, Soares MF, Zanata SM, Mangili OC, Gremski W, Veiga SS. 2004. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. *J Histochem Cytochem* 52:455–467.

- Lung JM, Mallory SB. 2000. A child with spider bite and glomerulonephritis: A diagnostic challenge. *Int J Dermatol* 39:287–289.
- Machado LF, Laugesen S, Botelho ED, Ricart CA, Fontes W, Barbaro KC, Roepstorff P, Sousa MV. 2005. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics* 5:2167–2176.
- Mitsutake S, Igarashi Y. 2007. Transbilayer movement of ceramide in the plasma membrane of live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359:622–627.
- Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN. 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 26:870–881.
- Murakami MT, Fernandes-Pedrosa MF, Tambourgi DV, Arni RK. 2005. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J Biol Chem* 280:13658–13664.
- Murakami MT, Fernandes-Pedrosa MF, de Andrade SA, Gabdoulkhakov A, Betzel C, Tambourgi DV, Arni RK. 2006. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem Biophys Res Commun* 342:323–329.
- Ochi S, Oda M, Nagahama M, Sakurai J. 2003. Clostridium perfringens alpha-toxin-induced hemolysis of horse erythrocytes is dependent on Ca²⁺ uptake. *Biochim Biophys Acta* 1613:79–86.
- Ochi S, Oda M, Matsuda H, Ikari S, Sakurai J. 2004. Clostridium perfringens alpha-toxin activates the sphingomyelin metabolism system in sheep erythrocytes. *J Biol Chem* 279:12181–12189.
- Oda M, Matsuno T, Shiihara R, Ochi S, Yamauchi R, Saito Y, Imagawa H, Nagahama M, Nishizawa M, Sakurai J. 2008. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by Clostridium perfringens alpha-toxin. *J Lipid Res* 49:1039–1047.
- Ramos-Cerrillo B, Olvera A, Odell GV, Zamudio F, Paniagua-Solis J, Alagon A, Stock RP. 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* 44:507–514.
- Ribeiro RO, Chaim OM, da Silveira RB, Gremski LH, Sade YB, Paludo KS, Senff-Ribeiro A, de Moura J, Chavez-Olortegui C, Gremski W, Nader HB, Veiga SS. 2007. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 50:1162–1174.
- Sakurai J, Nagahama M, Oda M. 2004. Clostridium perfringens alpha-toxin: Characterization and mode of action. *J Biochem* 136:569–574.
- Soares AM, Oshima-Franco Y, Vieira CA, Leite GB, Fletcher JE, Jiang MS, Cintra AC, Giglio JR, Rodrigues-Simioni L. 2002. Mn(2+) ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A(2) homologue from Bothrops jararacussu snake venom. *Int J Biochem Cell Biol* 34:668–677.
- Swanson DL, Vetter RS. 2006. Loxoscelism. *Clin Dermatol* 24:213–221.
- Tokumura A. 2004. Metabolic pathways and physiological and pathological significances of lysolipid phosphate mediators. *J Cell Biochem* 92:869–881.
- Udden MM. 2005. Effects of diethylene glycol butyl ether and butoxyethoxyacetic acid on rat and human erythrocytes. *Toxicol Lett* 156:95–101.
- Williams ST, Khare VK, Johnston GA, Blackall DP. 1995. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. A report of two cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 104:463–467.
- Wood BL, Gibson DF, Tait JF. 1996. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: Flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* 88:1873–1880.
- Young AR, Pincus SJ. 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* 39:391–400.

The Relationship Between Calcium and the Metabolism of Plasma Membrane Phospholipids in Hemolysis Induced by Brown Spider Venom Phospholipase-D Toxin

Daniele Chaves-Moreira,¹ Fernanda N. Souza,¹ Rosalvo T.H. Fogaça,² Oldemir C. Mangili,² Waldemiro Gremski,^{1,3} Andrea Senff-Ribeiro,¹ Olga M. Chaim,¹ and Silvio S. Veiga^{1*}

¹Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

²Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

³Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil

ABSTRACT

Brown spider venom phospholipase-D belongs to a family of toxins characterized as potent bioactive agents. These toxins have been involved in numerous aspects of cell pathophysiology including inflammatory response, platelet aggregation, endothelial cell hyperactivation, renal disorders, and hemolysis. The molecular mechanism by which these toxins cause hemolysis is under investigation; literature data have suggested that enzyme catalysis is necessary for the biological activities triggered by the toxin. However, the way by which phospholipase-D activity is directly related with human hemolysis has not been determined. To evaluate how brown spider venom phospholipase-D activity causes hemolysis, we examined the impact of recombinant phospholipase-D on human red blood cells. Using six different purified recombinant phospholipase-D molecules obtained from a cDNA venom gland library, we demonstrated that there is a correlation of hemolytic effect and phospholipase-D activity. Studying recombinant phospholipase-D, a potent hemolytic and phospholipase-D recombinant toxin (LiRecDT1), we determined that the toxin degrades synthetic sphingomyelin (SM), lysophosphatidylcholine (LPC), and lyso-platelet-activating factor. Additionally, we determined that the toxin degrades phospholipids in a detergent extract of human erythrocytes, as well as phospholipids from ghosts of human red blood cells. The products of the degradation of synthetic SM and LPC following recombinant phospholipase-D treatments caused hemolysis of human erythrocytes. This hemolysis, dependent on products of metabolism of phospholipids, is also dependent on calcium ion concentration because the percentage of hemolysis increased with an increase in the dose of calcium in the medium. Recombinant phospholipase-D treatment of human erythrocytes stimulated an influx of calcium into the cells that was detected by a calcium-sensitive fluorescent probe (Fluo-4). This calcium influx was shown to be channel-mediated rather than leak-promoted because the influx was inhibited by L-type calcium channel inhibitors but not by a T-type calcium channel blocker, sodium channel inhibitor or a specific inhibitor of calcium activated potassium channels. Finally, this inhibition of hemolysis following recombinant phospholipase-D treatment occurred in a concentration-dependent manner in the presence of L-type calcium channel blockers such as nifedipine and verapamil. The data provided herein, suggest that the brown spider venom phospholipase-D-induced hemolysis of human erythrocytes is dependent on the metabolism of membrane phospholipids, such as SM and LPC, generating bioactive products that stimulate a calcium influx into red blood cells mediated by the L-type channel. *J. Cell. Biochem.* 112: 2529–2540, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: PHOSPHOLIPASE-D; HEMOLYSIS; CALCIUM; LIPID METABOLITES; BROWN SPIDER; VENOM

The dermonecrotic toxin (phospholipase-D) present in the brown spider (genus *Loxosceles*) venom is a potent active molecule, with several biological effects on hemostasis and the inflammatory response. This molecule is part of a family of powerful

toxins containing several members with related activities [da Silva et al., 2004; Kalapothakis et al., 2007]. Members of this toxin family trigger platelet aggregation, cause hemolysis, increase vessel permeability, induce a potent inflammatory response, are related

Grant sponsor: Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná; Grant sponsor: Fundação Araucária; Grant sponsor: CNPq; Grant sponsor: CAPES.

*Correspondence to: Dr. Silvio S. Veiga, Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990. Curitiba, Paraná, Brazil. E-mail: veigass@ufpr.br

Received 9 November 2010; Accepted 3 May 2011 • DOI 10.1002/jcb.23177 • © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Published online 16 May 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

with nephropathy, and cause dermonecrosis after accidents [Chaim et al., 2006; Appel et al., 2008; Kusma et al., 2008; Chaves-Moreira et al., 2009].

Through proteomic approaches, and using crude venom of different *Loxosceles* species, the existence of 11 distinct toxins (*Loxosceles gaucho* venom) belonging to the family of phospholipases-D was reported [Machado et al., 2005], with three isoforms of phospholipases-D (*Loxosceles bonetti* venom) [Ramos-Cerrillo et al., 2004] and three toxin isoforms in the venom of *Loxosceles reclusa* [dos Santos et al., 2009]. Using molecular biology techniques, six different phospholipase-D isoforms were cloned and expressed from a cDNA library of the venom gland of *L. intermedia* [Chaim et al., 2006; da Silva et al., 2006, 2007a, b; Appel et al., 2008]. Additionally, from the venom glands of other *Loxosceles* species, the existence of other phospholipase-D isoforms was found, which increases the number of toxin members and strengthens the idea that they are a family of toxins that act synergistically [Binford et al., 2005; Kalapothakis et al., 2007].

The first studies regarding the biochemistry of the brown spider venom dermonecrotic toxin characterized this molecule as a sphingomyelinase-D, based on its activity to hydrolyze sphingomyelin (SM) into choline and C1P [Futrell, 1992]; however, based on lipid hydrolysis analysis following toxin treatments, the term phospholipase-D was postulated because members of this toxin family hydrolyzes sphingolipids and lysoglycerophospholipids, generating C1P or lysophosphatidic acid (LPA) [Lee and Lynch, 2005].

Some lipid metabolites that originate from cell membranes such as ceramide, C1P, sphingosine, sphingosine-1-phosphate, phosphatidic acid, and LPA are bioactive molecules essential for cell functions such as signal transduction, cell cycle arrest, apoptosis, plasma membrane viability, cell differentiation, and others [Ohanian and Ohanian, 2001; Anliker and Chun, 2004; Mitsutake and Igarashi, 2007].

Several case reports have described intravascular hemolysis following brown spider accidents [Williams et al., 1995; de Souza et al., 2008; McDade et al., 2010]. This hemolytic activity is confirmed by in vitro laboratory tests that pointed to *Loxosceles* venom phospholipase-D as a hemolytic agent [Ribeiro et al., 2007; Chaves-Moreira et al., 2009; Tambourgi et al., 2010]. The mechanism by which brown spider venom phospholipase-D causes hemolysis is currently under investigation. The degradation of membrane phospholipids by brown spider phospholipase-D triggered the synthesis of inflammatory molecules such as arachidonic acid and Prostaglandin E2 (PGE2) [Chalfant and Spiegel, 2005]. Phospholipase-related hemolysins from several pathogens have been shown to be involved in membrane fluidity and in the stimulation of calcium ion cytosolic activity [Lang et al., 2010; Oda et al., 2010]. Molecules such as PGE2, C1P, and LPA have been reported to increase intracellular calcium ion in erythrocytes in vitro [Yang et al., 2000; Chalfant and Spiegel, 2005; Kaestner et al., 2006].

Recently, we compared the hemolytic activities of one brown spider venom recombinant active phospholipase-D [Chaim et al., 2006] and this same molecule with a site-directed mutation H12A in the catalytic domain [Kusma et al., 2008]. The results showed hemolytic activity for active phospholipase-D and an absence of hemolytic activity for the mutated toxin, suggesting the direct

involvement of the catalysis in hemolysis [Chaves-Moreira et al., 2009]. Herein, using this same model of recombinant toxins, we present additional data that support a direct molecular mechanism dependent on the catalytic activity of phospholipase-D for hemolysis and the relationship between membrane phospholipids toxin-induced metabolism and calcium.

MATERIALS AND METHODS

REAGENTS

Polyclonal antibodies to phospholipase-D toxin were produced in rabbits as previously described [Luciano et al., 2004; Chaim et al., 2006]. Hyperimmune IgGs were purified from serum using a mixture of Protein-A and Protein-G Sepharose beads (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) as recommended by the manufacturer. All experimental protocols using animals were performed according to the "Principles of laboratory animal care" (NIH Publication no 85-23, revised 1985), "Brazilian Federal Laws," and the ethical committee agreement number 245 of the Federal University of Paraná. Verapamil, nifedipine, clotrimazole, flunarizine, procaine, ruthenium red, EDTA, CaCl₂, sucrose and alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Whole venom from *L. intermedia* was extracted from spiders captured from the wild as described by Feitosa et al. [1998].

RECOMBINANT PROTEIN CLONING AND EXPRESSION

The venom gland cDNA library was previously compiled [Chaim et al., 2006; da Silva et al., 2006]. The GenBank data deposition information for *L. intermedia* cloned LiRecDT1 cDNA is DQ218155, for LiRecDT2 cDNA, DQ266399, LiRecDT3 cDNA, DQ267927, LiRecDT4 cDNA, DQ431848, LiRecDT5 cDNA, DQ431849, and LiRecDT6 cDNA, EF474482.

The cDNA corresponding to the mature phospholipase-D LiRecDT1 protein was amplified by PCR. The forward primer used was 30Rec sense (50-CTCGAGGCAGGTAATCGTCGGCCTATA-30) and was designed to contain an *Xho*I restriction site plus the sequence that is related to the first seven amino acids of the mature protein. The reverse primer was 30Rec antisense (50-CGGGATCCT-TATTTCTTGAATGTCACCCA-30), which contains a *Bam*HI restriction site and a stop codon. The PCR product was cloned into a pGEM-T vector (Promega, Madison). The pGEM-T vector containing the cDNA, which encoded the mature protein, was then digested with *Xho*I and *Bam*HI restriction enzymes. The excised insert was gel purified using a QIAquick Gel 74 Extraction Kit (Qiagen, Valencia) and subcloned into a pET-14b vector (Novagen, Madison) digested with the same enzymes.

The cDNA corresponding to the other isoforms of dermonecrotic toxin "phospholipase-D" proteins were obtained according to da Silva et al. [2006] for LiRecDT2 and LiRecDT3, according to da Silva et al. [2007b] for LiRecDT4 and LiRecDT5, according to Appel et al. [2008] for LiRecDT6.

The mutated toxin LiRecDT1 H12A was obtained by a Megaprimer PCR method, which was performed with rounds of PCR to introduce a site-directed mutagenesis in the LiRecDT1 sequence [Kusma et al., 2008]. Briefly, the first round introduced the site-directed mutation into the first histidine amino acid residue of

the catalytic domain using the reverse primer P1H12A (50-ATTACCATGGCCCCATGATC-30), which was designed to contain the codon substitute for alanine plus the sequence related to the other original amino acids of the mature protein.

All recombinant constructs were expressed as fusion proteins, with a 6× His-Tag at the N terminus and a 13 amino acid linker (including a thrombin site) between the 6× His-Tag and the mature protein (N-terminal amino acid sequence before the mature protein: MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLE). pET-14b/L. *intermedia* cDNA constructs were transformed into One Shot *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS competent cells (Invitrogen, Carlsbad) and plated on LB agar plates containing 100 mg/ml ampicillin and 34 mg/ml chloramphenicol. A single colony was inoculated in 50 ml LB broth (100 mg/ml ampicillin and 34 mg/ml chloramphenicol) and grown overnight at 37°C. A 10 ml portion of this overnight culture was grown in 1 L of LB broth/ampicillin/chloramphenicol at 37°C until the OD at 550 nm reached 0.5. IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) was added to make a final concentration of 0.05 mM, and the culture was induced by incubation for an additional 3.5 h at 30°C (with vigorous shaking). Cells were harvested by centrifugation (4,000g, 7 min), and the pellet was frozen at -20°C overnight.

RECOMBINANT PROTEIN PURIFICATION

Cell suspensions were thawed and additionally disrupted by six cycles of 10 s of sonication at low intensity. Lysed materials were centrifuged (20,000g, 20 min), and the supernatants were incubated with 1 ml Ni²⁺-NTA agarose beads for 1 h at 4°C with gentle agitation. The suspensions were loaded into a column, and the packed gel was exhaustively washed with the appropriate buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) until the OD at 280 nm reached 0.01. Recombinant proteins were eluted with 10 ml of elution buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole), and 1 ml fractions were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions. Fractions were pooled and dialyzed against phosphate buffered saline (PBS).

ERYTHROCYTES

Human erythrocytes were obtained from healthy donors. The blood collection procedure was authorized by the ethical committee agreement of the Federal University of Paraná.

PREPARATION OF ERYTHROCYTES

After blood was harvested with acidic EDTA Na⁺ 5% and a 21-gauge needle (BD Plastipak, Franklin Lakes) on the day of each experiment, the platelet-rich plasma and buffy coat were removed by aspiration after centrifugation at 200g for 15 min. Packed erythrocytes were washed three times with tris buffer sucrose (TBS) for hemolysis assays (250 mM sucrose, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 280 mOsm/kg H₂O). Washed erythrocytes were resuspended in the appropriate buffer at a concentration of 5 × 10⁸ cells/ml.

DETERMINATION OF HEMOLYTIC ACTIVITY

The hemolysis assay was performed as described by Harris and Phoenix [1997]. Washed red blood cells (10⁸ cells) were added to each Eppendorf tube containing the appropriate concentration of

venom/toxin in TBS buffer (25 μ g/ml) without or with calcium (in a range of 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, or 10 mM), according to the experiments described in the Figure legends. For this assay, samples were performed in pentaplicate along with negative (in the presence of the TBS only; in a final volume of 400 μ l) and positive (red blood cells in distilled water and 0.1% (v/v) Triton X-100) controls. After 12 h (for hemolysis assays in the presence of calcium in the medium) or 24 h (for hemolysis assays in absence of calcium) of incubation with gentle agitation, controls, and samples were centrifuged at 4°C (3 min at 200g), and the absorbance of the supernatants were read immediately at 550 nm (ELISA ELX 800 Auto Reader, Meridian Diagnostics, Inc.). Absorbance values were converted to percent hemolysis using the absorbance values of the positive control as 100% lysis. Alternatively, toxin-induced hemolysis was evaluated, as reported above, but at time periods of 5, 15, 30, 60, 120, and 240 min following toxin treatment and in presence of 1 mM of calcium. The absorbance of supernatants was read at 550 nm, and the percentage of hemolysis was determined using the absorbance values induced by distilled water as 100% of hemolysis (positive control). The results represent an average of five experiments \pm SEM, ****P* \leq 0.0001.

PHOSPHOLIPASE ACTIVITY ASSAY

Phospholipase activity was measured using the Amplex Red Assay Kit (Molecular Probes, Eugene). In this assay, Phospholipase-D activity is monitored using 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red reagent), a sensitive fluorogenic probe for H₂O₂ [Appel et al., 2008]. First, recombinant phospholipase-D (LiRecDT1) hydrolyzes SM to yield ceramide-phosphate and choline. Then choline is oxidized by choline oxidase to betaine and H₂O₂. Finally, H₂O₂, in the presence of horseradish peroxidase, reacts with the Amplex reagent in a 1:1 stoichiometry to generate the highly fluorescent product, resorufin. All recombinant toxins (10 μ g each, in three trials) were added to the Amplex Red reagent mixture. The reaction tubes were incubated at 37°C for 30 min, and fluorescence was measured in a *fluorimeter* Tecan Infinite[®] M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland) using excitation at 540 nm with emission detection at 570 nm. The same method was used to test the hydrolysis ability of other phospholipids such as C16 *Lyso* PAF (1-*O*-hexadecyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine), Egg SM (Sphingomyelin Egg, Chicken), 16:0 *Lyso* PC (1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine) and 16:0-18:0 PC (1-palmitoyl-2-stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine); however, the SM in the kit was changed by other phospholipids and the choline generated was measured. All phospholipids were acquired from Avanti Polar Lipids, Inc. Alabaster, AL. Alternatively, to evaluate whether calcium directly controls the catalytic activity of recombinant phospholipase-D, phospholipase activity was measured identically as described above, but in the presence of calcium at concentrations of 0.1 and 10 mM.

CHOLINE RELEASE DETECTION FROM ERYTHROCYTE GHOST AND ERYTHROCYTE GHOST EXTRACT

Ghosts of erythrocyte membranes were obtained from approximately 5 × 10⁸ cells. Erythrocytes were lysed and washed in hypo-osmotic buffer (NaH₂PO₄ 5 mM, PMSF 2 mM, and pH 8.0). The lysed

cells were collected by centrifugation (12,000 *g*, 10 min, 4°C), and this procedure was repeated four times. The supernatant was aspirated and the lysed cells were white; therefore, they were practically hemoglobin-free.

The erythrocyte ghosts were resuspended in 1 ml of cold extraction buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 0.5%). After gently homogenizing for 10 min at 4°C, cells were centrifuged at 20,000 × *g* for 20 min at 4°C, and supernatants were collected for later use. Ghosts and extracts (100 µl) were utilized as a substrate for Whole Venom and LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A (100 µg) in a total final volume of 250 µl for 1 h at 37°C and gently mixed using a rotational shaker in the BOD incubator. The treated tubes were then added to a 250 µl reaction mixture adapted from the Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit (Molecular Probes) containing choline oxidase (4 U), alkaline phosphatase (80 U), horseradish peroxidase (20 U), and Amplex Red reagent (100 µM), excluding the SM substrate. After incubation in a water bath for 1 h at 37°C, fluorescence development was measured in a *fluorimeter* Tecan Infinite® M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland) using excitation at 540 nm with emission detection at 570 nm.

DEGRADATION OF SPHINGOMYELIN AND LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE

First, 100 mM Egg SM (Sphingomyelin Egg, Chicken) and 100 mM 16:0 Lyso PC (1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine) were dissolved in chloroform. Next, 5 mM SM and 5 mM LPC were diluted in TBS Buffer with 0.005% Triton X-100. Then materials were incubated with 25 µg/ml LiRecDT1 for 24 h with gentle agitation at 37°C, and controls (lipids without toxin treatment) and samples were centrifuged at 4°C (3 min at 200*g*). The supernatants were incubated with 5 µl Ni²⁺-NTA agarose beads for 12 h at 4°C with gentle agitation. Finally, the samples were centrifuged at 4°C (3 min at 200*g*), and fractions were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE and Coomassie Blue Dye under reduced conditions. For immunoblotting, proteins were transferred to nitrocellulose filters and immunostained using purified IgGs that react with dermonecrotic toxin LiRecDT1. The molecular mass markers were acquired from Sigma.

MEASUREMENT OF Ca²⁺ INFLUX INTO ERYTHROCYTES CONTAINING FLUO-4

Human erythrocytes (1 × 10⁸ cells/ml) were prepared in Ringer Solution (122.5 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 11 mM glucose, 1 mM NaH₂PO₄, pH 7.4, 300 mOsm/kg H₂O), containing 2.5 mM CaCl₂ and performed according with Kaestner et al. [2006] and Haase et al. [2009]. Erythrocytes were loaded with Fluo-4 AM (5 µM) in buffer with Pluronic F-127 (0.01%) for 30 min at 37°C. This indicator has a high affinity binding for Ca²⁺ (*K*_d = 345 nM) and a very large fluorescence intensity increase in response to Ca²⁺ binding (>100-fold). Subsequently, cells were washed twice with Ringer Solution and equilibrated for de-esterification for 30 min at room temperature. Cells were incubated with 25 µg/ml of recombinant phospholipase-D (LiRecDT1) and 25 µg/ml of mutated phospholipase-D (LiRecDT1 H12A) for 5, 15, 30, 45, 60, and 120 min. Additionally, 10 µM of the *ionophore* A23187 was used as a positive control. After the reaction, the cells were transferred into a 96-well plate at a density

of 1 × 10⁶ cells per well in a total volume of 100 µl. The resulting fluorescence was recorded on a *fluorimeter* Tecan Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland) using an excitation wavelength of 485 nm, and the emission was measured at 535 nm.

Moreover, Fluo-4 dye-loaded human erythrocytes were settled onto poly-L-lysine coated coverslips, and calcium images were performed using a Zeiss Axio Observer.Z1 inverted microscope (Carl Zeiss, Germany). The Fluo-4 AM was excited at 488 nm with emission using the LP 505 nm filter (green channel). Single images were obtained using the 63× oil lens for differential interface contrast (DIC) and fluorescence intensity with monochromatic camera (AxioCam HRm, Carl Zeiss). Finally, AxioVision LE software was used for image processing and for morphometric measures in the Zeiss image format (ZVI).

EFFECT OF CATIONIC CHANNEL BLOCKERS ON THE TOXIN-INDUCED HEMOLYSIS

To understand the toxin-stimulated Ca²⁺ uptake pathway, we investigated the effect of cationic channel blockers on toxin-induced Ca²⁺ entry and hemolysis. We performed the assay according with Ochi et al. [2003]. Cells were treated with 25 µM of Flunarizine (T-type Ca²⁺ channel blocker), 25 µM of Verapamil, 25 µM Nifedipine (L-type Ca²⁺ channel blockers), 25 µM of Clotrimazole (Gardos-type Ca²⁺-activated K⁺ channel blocker), 25 µM of Procaine (Na⁺ channel blocker), or 25 µM of ruthenium red (unspecific Ca²⁺ channel blocker). Then samples were incubated with 25 µg/ml of LiRecDT1 and 100 µM calcium in TBS Buffer for 12 h. The hemolytic activity was evaluated according to the previously mentioned method. Additionally, two calcium channel blockers (nifedipine and verapamil) were investigated upon toxin-induced hemolysis as described above, except they were used at serial concentrations of 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, and 1 mM and toxin-induced hemolysis detected as previously reported.

RESULTS

DIFFERENT MEMBERS OF PHOSPHOLIPASE-D-FAMILY TOXINS OF BROWN SPIDER VENOM CAUSE DISTINCT LEVELS OF HEMOLYSIS

Previously, we provided experimental data reporting direct hemolysis of human erythrocytes following treatment with a phospholipase-D toxin-family member (LiRecDT1) expressed as a recombinant toxin from a cDNA library of the *Loxosceles intermedia* venom gland [Chaim et al., 2006; Chaves-Moreira et al., 2009]. We cloned and expressed six different isoforms of brown spider venom phospholipase-D; therefore, we studied their hemolytic activity on human erythrocytes. Additionally, we studied LiRecDT1H12A, a recombinant phospholipase-D isoform, with a mutation by substitution of a residue of histidine by alanine at the catalytic site [Chaim et al., 2006; Chaves-Moreira et al., 2009]. Figure 1A depicts hemolysis of human red blood cells incubated with six different isoforms of recombinant phospholipase-D, and a mutated isoform expressed and purified under the same experimental conditions, named LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT4, LiRecDT5, LiRecDT6, and LiRecDT1H12A. As observed, the treatment of erythrocytes with different toxin isoforms under the same experimental conditions caused different percentages of

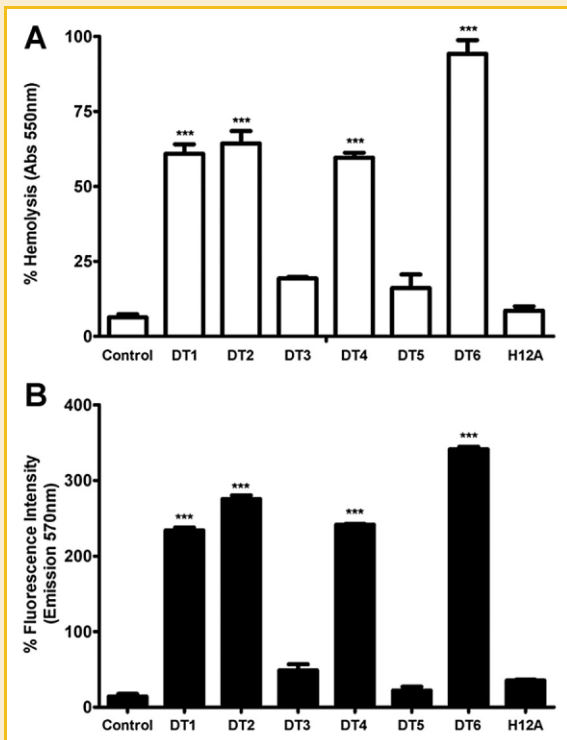


Fig. 1. Different members of phospholipase-D family toxins of brown spider venom cause distinct levels of hemolysis and have different phospholipase-D activity. A: Human erythrocytes were exposed to 25 μ g/ml of different purified recombinant phospholipase-D toxins named LiRecDT1 (DT1), LiRecDT2 (DT2), LiRecDT3 (DT3), LiRecDT4 (DT4), LiRecDT5 (DT5), LiRecDT6 (DT6), and LiRecDT1H12A (H12A) for 24 h at 37°C and were evaluated for hemolysis. As a control, erythrocytes were incubated in the absence of toxins but under the same laboratory conditions. The results show an average of five experiments \pm SEM. *** $P \leq 0.0001$. B: Alternatively, phospholipase-D activity of purified recombinant toxins was evaluated using a fluorimetric method with the Amplex Red Assay Kit at 37°C for 30 min as shown in the Materials and Methods section. The control was a reaction in the absence of any toxin. The product of a reaction was determined at 540 nm (absorption) with emission detection at 570 nm. Reactions used 10 μ g of each toxin in triplicate. Values given are the average \pm SEM, *** $P \leq 0.0001$.

hemolysis. Additionally, Figure 1B shows that these same toxin isoforms have different phospholipase-D activity. The results suggest a correlation between hemolysis induced by toxins and their phospholipase-D activity (catalysis).

THE RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE-D ISOFORM LIRECDT1 CAUSES DEGRADATION OF SYNTHETIC PHOSPHOLIPIDS AND PHOSPHOLIPIDS OF THE CYTOPLASMIC MEMBRANE OF HUMAN ERYTHROCYTES

To determine the specificity and which kind of phospholipid(s) is degraded by LiRecDT1, different synthetic phospholipids such as sphingomyelin (SM), a sphingophospholipid, and lysophosphatidylcholine (LPC), lyso-platelet activating factor (LPAF), and phosphatidylcholine (PC), glycerophospholipids, were treated with LiRecDT1 under the same experimental conditions, and choline generation was evaluated using a fluorimetric method. As shown in Figure 2A, recombinant toxin was able to degrade SM, LPC, and LPAF but did

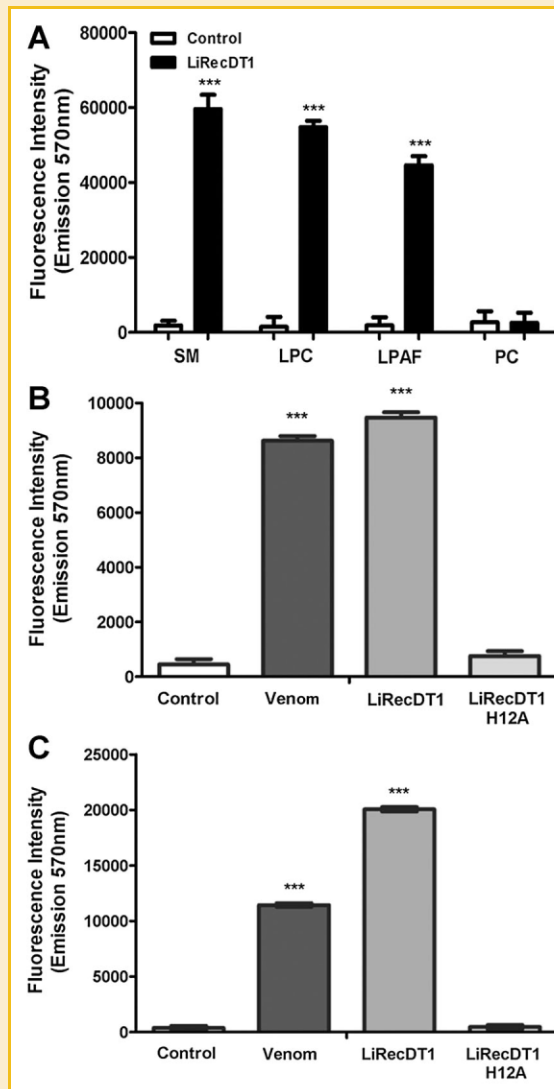


Fig. 2. The recombinant phospholipase-D LiRecDT1 degrades synthetic phospholipids and phospholipids of the plasma membrane of human erythrocytes. A: The ability of recombinant phospholipase-D to degrade phospholipids was evaluated through a fluorimetric method using an Amplex Red Assay Kit, substituting a phospholipid substrate by synthetic phospholipids such as sphingomyelin (SM), lysophosphatidylcholine (LPC), lyso-platelet activating factor (LPAF), and phosphatidylcholine (PC) and verifying the production of choline after phospholipids/toxin exposure at 37°C for 30 min (see Materials and Methods for details). As a negative control, phospholipids were incubated in the absence of toxin but under the same laboratory conditions. The results show an average of five experiments \pm SEM. *** $P \leq 0.0001$. As shown, recombinant toxin was able to degrade SM, LPC, and LPAF, under the conditions evaluated. Additionally, ghosts of human red blood cells (B) or detergent extract of human erythrocytes (C) were treated with crude venom, recombinant phospholipase-D LiRecDT1, recombinant toxin LiRecDT1H12A (H12A), and in the absence of toxins but under the same laboratory conditions as a negative control. The generation of choline was analyzed by a fluorimetric assay under identical conditions as described above. The results show an average of five experiments \pm SEM. *** $P \leq 0.0001$. As depicted, both crude venom and LiRecDT1 degraded phospholipids of ghost and detergent extract of human erythrocytes, compared to the negative control and mutated toxin that did not generate choline.

not act on PC under the conditions used. Additionally, to ascertain whether this recombinant phospholipase-D could change the levels of phospholipids present in the cytoplasmic membrane of erythrocytes, ghosts of human red blood cells (Fig. 2B) or detergent extract of human erythrocytes (Fig. 2C) were treated with crude venom, LiRecDT1, and LiRecDT1H12A, and the generation of choline was analyzed by a fluorimetric assay. As depicted in figures, production of choline was observed following crude venom and LiRecDT1 treatments but not after LiRecDT1H12A in both situations, supporting the accessibility and activity of recombinant phospholipase-D on membrane erythrocyte phospholipids.

THE PRODUCTS OF DEGRADATION OF SPHINGOMYELIN AND LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINE FOLLOWING TREATMENT WITH RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE-D CAUSE HEMOLYSIS OF HUMAN BLOOD CELLS

With the goal of confirming the relationship between the metabolism of phospholipids and hemolytic activity induced by recombinant phospholipase-D, we next treated synthetic SM, or LPC, or both phospholipids together (Fig. 3A) with recombinant phospholipase-D. The products made were submitted to affinity chromatography on Ni^{2+} -agarose to remove His-tag phospholipase-D. The efficiency of chromatography was confirmed by electrophoresis visualized by Coomassie Blue dye and by immunoblotting using antibodies to the recombinant toxin (Fig. 3B,C). After chromatography, the products (flow through) were sequentially incubated with human erythrocytes. As shown, when red blood cells were incubated with the product of the degradation of SM, LPC, or both the products of degradation together, lyses of cells occurred, suggesting that the products of metabolism of phospholipids following recombinant phospholipase-D treatment can induce hemolysis.

RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE-D-INDUCED HEMOLYSIS INCREASES IN A CALCIUM-DEPENDENT MANNER

Several literature reports have described a role for calcium in hemolysis that is induced by products of metabolism of phospholipids [Yang et al., 2000; Ochi et al., 2003]. With the objective to verify the involvement of calcium on recombinant phospholipase-D-induced hemolysis, we next analyzed the hemolytic activity of recombinant phospholipase-D on washed human red blood cells with increasing concentrations of calcium. Human erythrocytes were incubated in synthetic medium containing increased doses of calcium (0–10 mM) and the same concentration of LiRecDT1, and the percentage of hemolysis was determined (Fig. 4A). As shown, the percentage of hemolysis increased with an increase in the dose of calcium. Additionally, we repeated hemolytic assays using other isoforms of recombinant toxins such as LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT4, LiRecDT5, LiRecDT6, and LiRecDT1H12A, and we compared hemolysis in the absence or in the presence of 1 mM of calcium. As depicted in Figure 4B, an increase in the hemolytic activity of all toxin isoforms in the presence of calcium was observed. These data suggested the possibility that the phospholipase-D-induced metabolism of phospholipids constituents of membrane may play a role in calcium influx or that calcium may directly control the activity of enzyme.

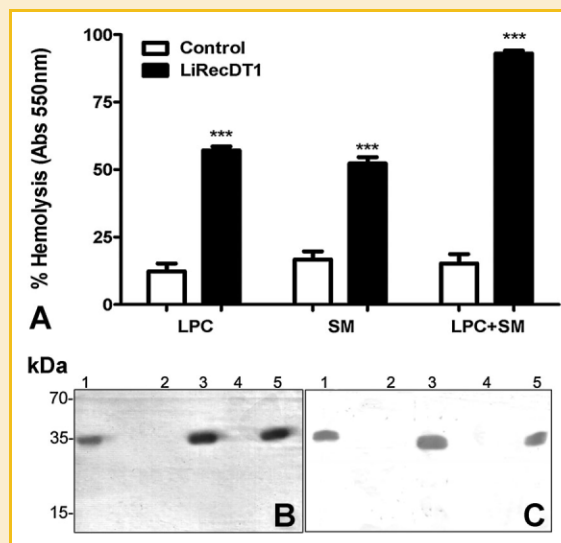


Fig. 3. The products of degradation of sphingomyelin and lysophosphatidylcholine following treatment with recombinant phospholipase-D caused hemolysis of human blood cells (A). Synthetic sphingomyelin (SM) and lysophosphatidylcholine (LPC) were incubated with purified recombinant toxin LiRecDT1 at the concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, for 24 h at 37°C. The products created following phospholipid treatment with toxin were submitted to affinity chromatography on Ni^{2+} -agarose to remove phospholipase-D. Human erythrocytes were incubated for 24 h at 37°C with the product of degradation of sphingomyelin after toxin treatment (SM), the product of degradation of lysophosphatidylcholine after toxin exposure (LPC), or both products of degradation of phospholipids together (SM + LPC) following Ni^{2+} -chromatography (flow through). As a negative control, erythrocytes were incubated with purified synthetic phospholipids before toxin treatment. B,C: Shows SDS-PAGE under reducing conditions of products of degradation of phospholipids after chromatography that were visualized by Coomassie Blue dye or immunoblotting using an antibody specific to recombinant toxin, respectively. Molecular protein masses are shown on the left of figures. Lanes 1 contain purified toxin, lanes 2 depict flow through of Ni^{2+} -chromatography of sphingomyelin-toxin treated mixture. Lanes 3 show eluate of Ni^{2+} -chromatography of sphingomyelin-toxin treated mixture. Lanes 4 contain flow through of Ni^{2+} -chromatography of lysophosphatidylcholine-toxin treated mixture. Lanes 5 show eluate of Ni^{2+} -chromatography of lysophosphatidylcholine-toxin treated mixture. As shown, no toxin was observed in the products of degradation of phospholipids after Ni^{2+} -chromatography.

CALCIUM DOES NOT CHANGE THE CATALYTIC ACTIVITY OF RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE-D. RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE-D CAUSES AN INFLUX OF CALCIUM IN HUMAN ERYTHROCYTES

To better understand the relationship between the molecular pathways regulating the metabolism of phospholipids induced by phospholipase-D and calcium ions, we analyzed whether calcium directly controls the catalytic activity of recombinant phospholipase-D, measuring the phospholipase-D activity in the presence of different concentrations of calcium, and we used SM as a substrate for a fluorimetric assay. As depicted in Figure 5A, no change in phospholipase-D activity was witnessed when the toxin was incubated with different calcium concentrations, suggesting that calcium does not directly control the catalytic activity of the enzyme because lower and higher calcium concentrations induced phospholipase-D activity in a similar manner. To ascertain the

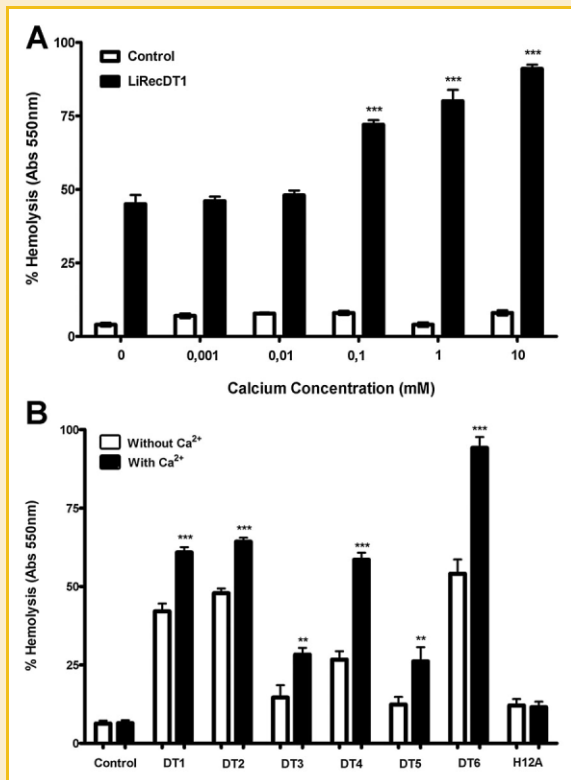


Fig. 4. Recombinant phospholipase-D toxin-induced hemolysis increases in a calcium-dependent manner. A: Human erythrocytes were incubated with 25 $\mu\text{g/ml}$ of purified recombinant toxin (LiRecDT1) or in the absence of toxin (negative control) for 12 h at 37°C and with increasing concentrations of calcium (0–10 mM). The absorbance of supernatants was read at 550 nm, and the percentage of hemolysis was determined using the absorbance values induced by distilled water as 100% of hemolysis. The results represent an average of five experiments \pm SEM. *** $P \leq 0.0001$. B: Additionally, we compared the hemolysis caused by all different isoforms of phospholipases-D (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT3, LiRecDT4, LiRecDT5, LiRecDT6, and LiRecDT1-H12A) in the absence or presence of 10 mM of calcium. Hemolysis was determined under identical conditions as described above. As a control, hemolysis was evaluated by incubating cells with toxins using a buffer without calcium. The results represent average of five experiments \pm SEM. *** $P \leq 0.0001$. As observed, toxin-induced hemolysis occurs in a calcium concentration-dependent manner for LiRecDT1, and for all toxin isoforms studied, the presence of calcium increased the percentage of hemolysis, except for the toxin with modification at the catalytic site H12A.

relationship between phospholipase-D activity, the metabolism of erythrocyte phospholipids and calcium and to evaluate whether toxin treatment induces a calcium influx into erythrocytes, we examined calcium influx into erythrocytes following recombinant phospholipase-D treatment in the presence of Fluo-4, a cell permeable and calcium-sensitive fluorophore. As shown in Figure 5B, phospholipase-D treatment (LiRecDT1) but not LiRecDT1H12A (toxin mutated at the catalytic site) caused an increase of fluorescence in erythrocytes in a time-dependent manner. Additionally, fluo-4 loaded erythrocytes were treated with recombinant phospholipase-D in different time intervals, and the cells were observed using an inverted microscope for DIC and fluorescence intensity (see details in Materials and Methods section).

An increase in fluorescence and calcium up take was observed relative to the time following toxin treatment (Fig. 5C), strengthening the idea that toxin exposure induced a calcium influx into the cells and a relationship exists among toxin-induced metabolism of phospholipids (catalysis), calcium, and hemolysis. This finding is corroborated by toxin-induced hemolysis of human erythrocytes incubated with the same concentration of recombinant phospholipase-D as used for the calcium uptake experiment (Fig. 5C) at different time intervals. As shown (Fig. 5D), hemolysis occurred in a time-dependent manner, but it has initiated only 1 h following toxin exposure. At this point, the calcium concentration inside the cells was sufficiently high to induce hemolysis, which was not as a consequence of membrane leakage.

RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE-D INDUCED HEMOLYSIS DEPENDS ON A CALCIUM CHANNEL

Additionally, we investigated whether recombinant toxin induces calcium influx into human erythrocytes using calcium channel inhibitors. Washed human erythrocytes were incubated with recombinant phospholipase-D (LiRecDT1) in the presence of calcium and different calcium channel inhibitors such as ruthenium red (unspecific calcium channels inhibitor), nifedipine and verapamil (selective calcium channel L-type inhibitors), clotrimazole (specific inhibitor of Ca^{2+} -activated K^{+} channel), flunarizine (selective calcium channel T-type inhibitor), and procaine (sodium channel inhibitor, as negative control). As shown in Figure 6A, only ruthenium red, nifedipine, and verapamil inhibited toxin-induced hemolysis, suggesting that calcium influx and the participation of calcium channel L-type play a role in Brown spider phospholipase-D-induced hemolysis. Additionally, to strengthen the idea that calcium channel L-type plays a role in hemolysis, we examined hemolysis induced by recombinant phospholipase-D by incubating washed erythrocytes treated with phospholipase-D in the presence of calcium and various concentrations of nifedipine and verapamil (L-type Ca^{2+} channel blockers). As shown in Figure 6B, nifedipine and verapamil caused the inhibition of hemolysis occurred in a concentration-dependent manner, corroborating the evidence of a calcium influx dependent on a L-type channel. As observed, nifedipine blocked hemolysis more efficiently compared to verapamil, which strengthened the hypothesis of calcium influx playing a role in hemolysis stimulated by brown spider phospholipase-D.

DISCUSSION

The mechanism by which the venom exerts its hemolytic effect is currently under investigation. Blood cell lysis induced by *Loroseles* spider venom has been demonstrated based on the clinical features observed in accident victims, which include hematuria, hemoglobinuria, proteinuria, elevated creatine kinase levels, and shock [Williams et al., 1995; Bey et al., 1997; Lung and Mallory, 2000; França et al., 2003]. Additionally, a great number of case reports have described hemolysis following brown spider accidents [Murray and Seger, 1994; Williams et al., 1995; de Souza et al., 2008].

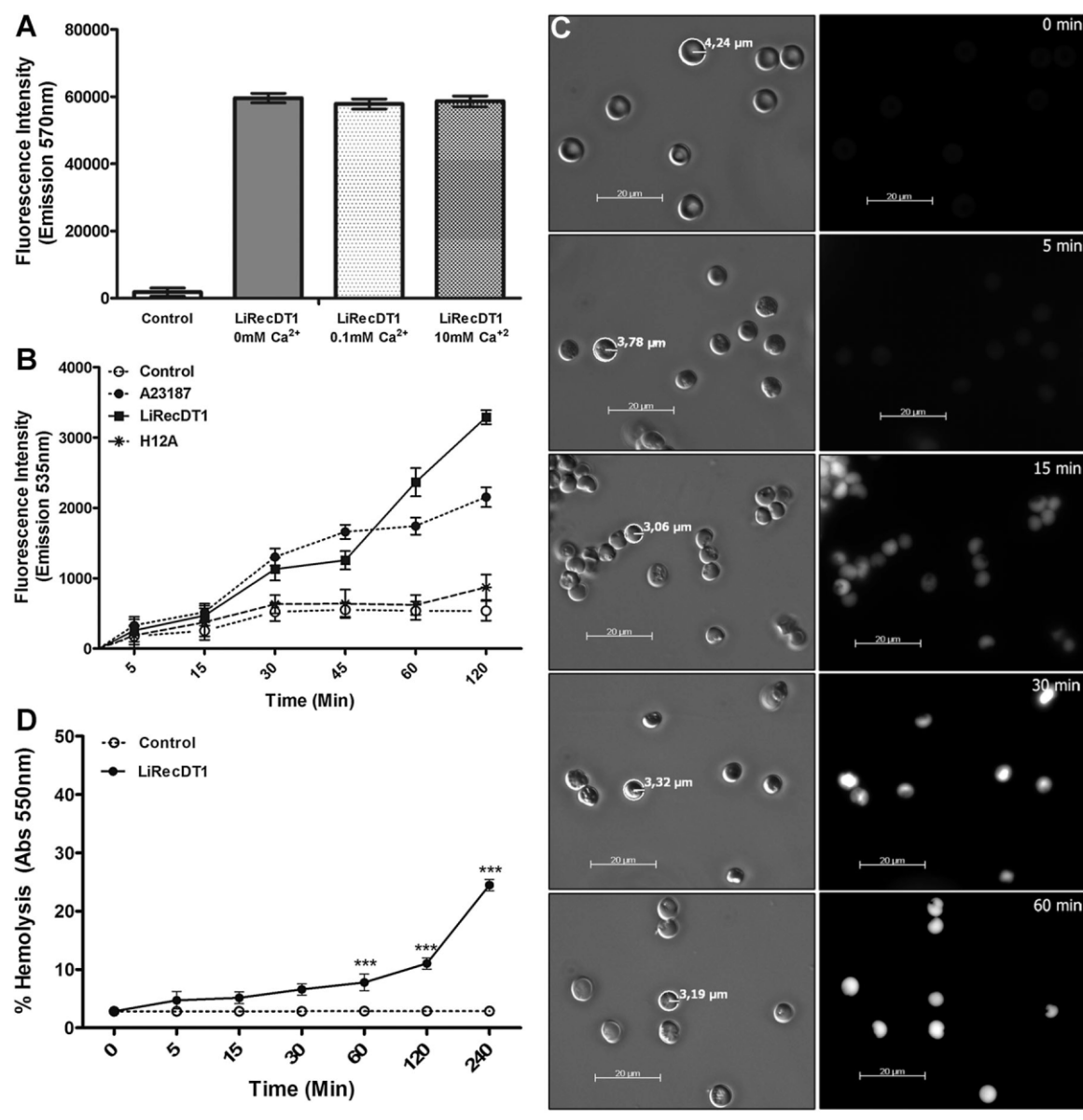


Fig. 5. Comparative phospholipase-D activity of purified recombinant toxin (LiRecDT1) in the absence and in the presence of different calcium concentrations. Human erythrocyte treatment with recombinant phospholipase-D causes an influx of calcium (A). Initially, phospholipase-D activity of LiRecDT1 was evaluated in the absence or in the presence of 0.1 and 10 mM of calcium with the Amplex Red fluorimetric assay at 37°C for 30 min. The product of the reaction was determined at 540 nm (absorption) with emission detection at 570 nm. As a negative control, PBS was used. As observed, variation in the calcium concentration did not change phospholipase-D activity (B). Next, we analyzed the effect of phospholipase-D treatment on calcium uptake into human erythrocytes. Human erythrocytes in the presence of Fluo-4 were incubated with LiRecDT1 in a calcium containing buffer, and fluorescence of Fluo-4 was measured after various periods. As a negative control, erythrocytes were incubated under the same laboratory conditions but in the absence of toxin treatment. As a positive control, erythrocytes were incubated with a calcium ionophore A23187. Comparatively, LiRecDT1H12A with mutation on the catalytic site was also used. As detected, there was an increase in the uptake of calcium in a time-dependent manner following LiRecDT1 exposure, but no calcium uptake was observed after LiRecDT1H12A treatment (C). Additionally, human erythrocytes were exposed to 25 μ g/ml of recombinant phospholipase-D (LiRecDT1) for different times (5, 15, 30, and 60 min) and then observed by transmission microscopy with DIC and fluorescence imaging of fluor-4-loaded cells. The control represents erythrocytes in the absence of toxin but fluor-4-loaded. As shown, toxin treatments induced an increase of calcium inside cells in a time-dependent manner. Scale bars are shown at the (D). Erythrocytes were incubated with 25 μ g/ml of LiRecDT1 over different time periods.

The brown spider venom phospholipase-D (also named dermonecrotic toxin) is the best-known toxin found in different *Loxosceles* species venom. Currently, a family of related molecules characterized as phospholipases-D is thought to exist [Kalapothakis et al., 2007]. The family-members of phospholi-

pase-D toxins contribute to the major deleterious effects of brown spider bites, including hemolysis [Forrester et al., 1978], platelet aggregation [Kurpiewski et al., 1981], blood vessel hyperpermeability [da Silveira et al., 2006], nephrotoxicity

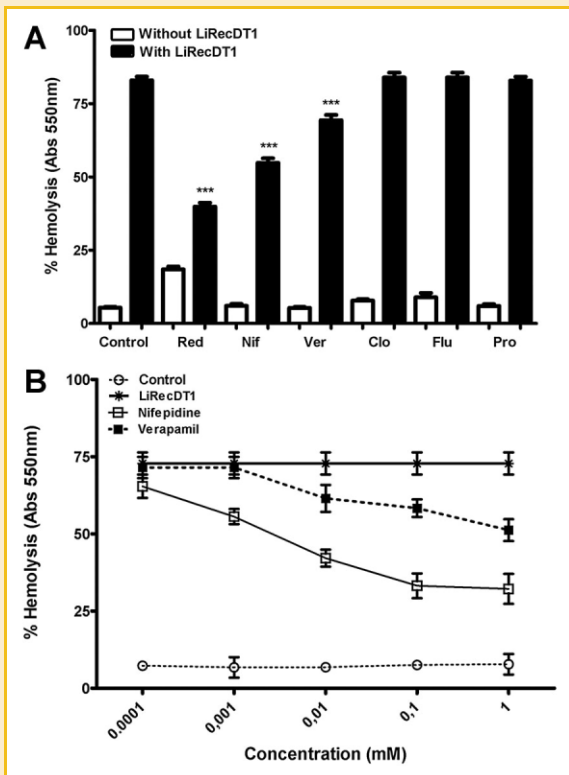


Fig. 6. Recombinant phospholipase-D-induced hemolysis depends on a Calcium channel. A: To study the influence of calcium channel blockers upon toxin-induced hemolysis, human erythrocytes were incubated with or without phospholipase-D toxin (LiRecDT1) in the presence of various ion channel blockers such as ruthenium red (Red) (unspecific calcium channels inhibitor), nifedipine (Nif) and verapamil (Ver) (selective calcium channel L-type inhibitors), clotrimazole (Clo) (specific inhibitor of Ca^{2+} -activated K^+ channel), flunarizine (Flu) (selective calcium channel T-type inhibitor), and procaine (Pro) (sodium channel inhibitor). As a control for positive hemolysis, erythrocytes were incubated with recombinant toxin but in the absence of ion channel inhibitors. Hemolysis was determined as previously described above. The results represent an average of five experiments \pm SEM. *** $P \leq 0.0001$ (B). Additionally, we examined hemolysis induced by recombinant phospholipase-D (LiRecDT1), incubating washed erythrocytes treated by phospholipase-D, in the presence of calcium and various concentrations of nifedipine and verapamil. As observed, both calcium channel inhibitors blocked toxin-induced hemolysis in a dose-dependent way. The results represent the average of five experiments \pm SEM.

and mouse lethality [Chaim et al., 2006; Kusma et al., 2008], and typical dermonecrotic lesions [Futrell, 1992; da Silva et al., 2004].

Evidence for the participation of phospholipase-D family members playing a role in hemolysis following brown spider bites comes from experimental data using native and/or recombinant toxins [Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Ribeiro et al., 2007]. It was described that crude venom toxins or purified native phospholipase-D toxin bind directly to the membranes of erythrocytes and lyses these cells, and it was postulated that such an interaction with the membranes of erythrocytes is through SM [Futrell, 1992]. Recently, by studying recombinant phospholipase-D (LiRecDT1) [Chaim et al., 2006] compared to a mutated isoform LiRecDT1 H12A [Kusma et al., 2008] that had a substitution of a residue of histidine at position 12

by a residue of alanine at the catalytic site of the toxin [Murakami et al., 2006], we were able to identify a direct hemolytic effect for LiRecDT1 toxin. We described that this effect is dependent on catalysis because the mutated isoform was depleted of hemolytic activity [Chaves-Moreira et al., 2009]. By studying human erythrocytes treated with recombinant phospholipase-D and immunostained with antibodies against this toxin or red blood cells treated with a recombinant fusion toxin GFP-LiRecDT1 and analyzed by confocal microscopy, specific binding was reported of recombinant phospholipase-D to the membrane of erythrocytes [Chaves-Moreira et al., 2009].

Herein, we studied recombinant isoforms of the phospholipase-D toxin from the *L. intermedia* venom gland and searched for a relationship among hemolysis of human erythrocytes, phospholipase-D catalysis, phospholipids metabolism, and calcium. Initially, by analyzing six different isoforms of recombinant phospholipase-D, our experimental results support a differential activity of hemolysis according to the isoform of the toxin used. Additionally, there is a correlation between phospholipase-D activity (analyzed by degradation of SM treated by distinct isoforms of toxin and a fluorimetric assay) and the percentage of hemolysis because isoforms of the toxin with high hemolytic effect have high phospholipase-D activity. These results are in agreement with literature data, which have reported that phospholipase catalysis plays a role in hemolysis [Ochi et al., 2004; Oda et al., 2008; Chaves-Moreira et al., 2009].

To prove that phospholipase-D catalysis and the degradation of membrane phospholipids play a role in the lysis of human red blood cells, we additionally showed that a recombinant phospholipase-D (LiRecDT1) isoform was able to degrade SM, LPC, and *lyso*-platelet activating factor, some of which are very important membrane constituents of human erythrocytes [Virtanen et al., 1998]. Additionally, we described that detergent extract of human erythrocytes and erythrocyte ghosts treated with LiRecDT1 generated the production of choline, detected by a fluorimetric assay. Based on these results, it appears that the toxin does stimulate the hydrolysis of important synthetic phospholipid constituents of membrane erythrocytes, and additionally, has the accessibility and activity of both erythrocyte membrane detergent extract and erythrocyte ghost phospholipids (proved by the generation of choline). These observations, together with literature data [Futrell, 1992; Chaves-Moreira et al., 2009], indicate that recombinant phospholipase-D can interact with erythrocyte membrane constituents, has hydrolytic activity toward purified phospholipids, and can directly metabolize phospholipids structurally organized on membrane erythrocytes, or extracted from erythrocyte membranes. The absence of a nucleus in human erythrocytes precludes the cell from synthesizing new proteins in response to extracellular stimuli; therefore, together with the lack of organelles such as the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus that precludes the cell to regenerate the plasma membrane, we speculated that the toxin-induced membrane phospholipid metabolism and generated products are directly related to red blood cell lysis.

It is well known that the enzymatic activity of phospholipase-D on SM generates choline plus ceramide1-phosphate, and phospholipase-D catalysis on LPC produces choline plus LPA [Anliker and

Chun, 2004; Moolenaar et al., 2004; Lee and Lynch, 2005]. Both ceramide 1-phosphate and its metabolites such as ceramide, sphingosine and sphingosine 1-phosphate, and LPA are potent bioactive molecules related with biological functions including cell survival, mammalian inflammatory response, cellular differentiation, cellular senescence, apoptosis, cell proliferation, platelet aggregation, and hemolysis [Yang et al., 2000; Ohanian and Ohanian, 2001; Chalfant and Spiegel, 2005]. After reporting that recombinant phospholipase-D was able to hydrolyze synthetic and erythrocyte membrane phospholipids, we next showed that the products of metabolism of synthetic SM and LPC following treatments with recombinant phospholipase-D, after removing the phospholipase of mixture, and when incubated with washed human erythrocytes caused hemolysis of cells. The product of degradation of SM following toxin incubation caused lysis of cells, and the product of hydrolysis of LPC also lysed cells. Additionally, interestingly, when both degradation products were mixed, the percentage of hemolysis increased. These observations indicate that the products generated by toxin-activated metabolism of SM and metabolism of LPC plays a role in hemolysis of human cells. Therefore, it appears that the toxin stimulates the production of ceramide 1-phosphate from SM (a lipid constituent of erythrocyte membrane), generates LPA from LPC (another lipid constituent of erythrocyte membrane), and these bioactive lipid metabolites lead to hemolysis of human erythrocytes as reported in several examples in the literature [Oda et al., 2008; Oda et al., 2010; Ohanian and Ohanian, 2001].

Additionally, we detected that the percentage of hemolysis induced by the treatment of washed erythrocytes with recombinant phospholipase-D occurs in a calcium-dependent concentration manner because hemolysis increases following toxin exposure, and it also increases depending on calcium doses used in the medium. Therefore, this result showed that the activation of phospholipid metabolism and hemolysis after toxin exposure stimulated calcium influx related to lyses of cells, which is in agreement with literature data that report that other toxin-induced hemolysis such as *Clostridium perfringens* alpha-toxin is dependent on calcium uptake [Ochi et al., 2003]. Moreover, an influx of calcium ions inside erythrocytes following phospholipase-D treatment is supported by experiments using Fluo-4, a cell permeable and calcium-sensitive fluorophore, which showed an increase in fluorescence after toxin treatment. Finally, the above mentioned results, which demonstrated that calcium is required in brown spider phospholipase-D-induced hemolysis, are in agreement with the data described by Yang et al. [2000], who reported that LPA (a product generated following toxin treatment of cells) induces calcium entry in human erythrocytes.

Alternatively, calcium may directly control the catalytic activity of phospholipase-D by binding to some region of this enzyme, which may contribute to an increase in lipid catalysis. The catalytic region of brown spider phospholipase-D is a metal coordinated domain that is dependent on magnesium [Murakami et al., 2005, 2006]. Calcium and magnesium belong to the same chemical family of alkaline earth metals. However, no changes in the measurement of phospholipase-D activity (using SM as substrate) were observed in the presence of different increasing doses of calcium. Therefore, the idea that phospholipase-D-induced hemolysis is controlled by

direct binding of calcium, stimulating catalysis activation in the enzyme, was refused. Together with the above mentioned results, our data show that brown spider phospholipase-D-induced hemolysis is dependent on an extracellular influx of calcium because the absence of smooth endoplasmic reticulum and mitochondria in erythrocytes (two organelles related with intracellular store of calcium) prevents the erythrocyte from discharging intracellular stores of this ion.

To understand whether calcium influx into erythrocytes following recombinant phospholipase-D treatment was a consequence of a leakage of membrane of cells or as consequence of the activation of calcium channel, we analyzed toxin-induced hemolysis in the presence of different ion channel blockers or with different calcium channel inhibitors. A decrease of percentage of hemolysis after toxin treatment was observed just in the presence of ruthenium red (an unspecific calcium channel inhibitor) and nifedipine (selective calcium channel L-type blocker). No changes were observed in toxin-induced hemolysis in the presence of other inhibitors such as procaine (sodium channel blocker), flunarizine (calcium channel T-type blocker), or clotrimazole (specific inhibitor of Ca^{2+} -activated K^{+} channels "Gardos-type"). Based on the results reported herein, we can conclude that the influx of extracellular calcium into human erythrocytes after recombinant phospholipase-D exposure is channel mediated rather than as a consequence of leakage promoted by enzymes acting on erythrocyte plasma integrity. Additionally, the experiments showing that toxin-induced hemolysis occurs just after calcium up take and appears at least 2 h following toxin treatment corroborate this hypothesis. Finally, the fact that nifedipine and verapamil (two calcium channel L-type inhibitors) blocked toxin-induced hemolysis in a dose-dependent manner, strengthened the hypothesis that calcium influx occurs through a L-type channel and plays a role in hemolysis.

Interestingly, the experiments performed using higher doses of nifedipine or verapamil (calcium L-type channel blockers) showed that the inhibition of hemolysis after recombinant toxin exposure although clear, was partial. These observations suggest that mechanisms other than calcium influx can contribute to hemolysis. It has been reported that lipid mediators such as those produced following phospholipase-D treatment of cells (ceramide 1-phosphate or its metabolites and LPA), can activate several intracellular signaling cascades that may also contribute to hemolysis. For instance, these bioactive lipids interact with G-protein-coupled receptors that activate oncogenes such as *Rho* and *Ras*, PLC, PI3K, and adenylyl cyclase, which may contribute to hemolysis [Spiegel, 2003; Anliker and Chun, 2004].

In conclusion, we have shown herein that the metabolism of membrane phospholipids such as SM and LPC and the influx of calcium mediated by a L-type channel in human erythrocytes treated with brown spider venom recombinant phospholipase-D is involved in hemolysis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, CNPq, and CAPES-Brazil.

REFERENCES

- Anliker B, Chun J. 2004. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 279:20555–20558.
- Appel MH, da Silveira RB, Chaim OM, Paludo KS, Silva DT, Chaves DM, da Silva PH, Mangili OC, Senff-Ribeiro A, Gremski W, Nader HB, Veiga SS. 2008. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim Biophys Acta* 1780:167–178.
- Bey TA, Walter FG, Lober W, Schmidt J, Spark R, Schlievert PM. 1997. *Loxosceles arizonica* bite associated with shock. *Ann Emerg Med* 30:701–703.
- Binford GJ, Cordes MH, Wells MA. 2005. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: Evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon* 45:547–560.
- Chaim OM, Sade YB, da Silveira RB, Toma L, Kalapothakis E, Chavez-Olortegui C, Mangili OC, Gremski W, von Dietrich CP, Nader HB, Sanches Veiga S. 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 211:64–77.
- Chalfant CE, Spiegel S. 2005. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: Expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci* 118:4605–4612.
- Chaves-Moreira D, Chaim OM, Sade YB, Paludo KS, Gremski LH, Donatti L, de Moura J, Mangili OC, Gremski W, da Silveira RB, Senff-Ribeiro A, Veiga SS. 2009. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J Cell Biochem* 107:655–666.
- da Silva PH, da Silveira RB, Appel MH, Mangili OC, Gremski W, Veiga SS. 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* 44:693–709.
- da Silveira RB, Chaim OM, Mangili OC, Gremski W, Dietrich CP, Nader HB, Veiga SS. 2007a. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* 49:758–768.
- da Silveira RB, Pigozzo RB, Chaim OM, Appel MH, Dreyfuss JL, Toma L, Mangili OC, Gremski W, Dietrich CP, Nader HB, Veiga SS. 2006. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie* 88:1241–1253.
- da Silveira RB, Pigozzo RB, Chaim OM, Appel MH, Silva DT, Dreyfuss JL, Toma L, Dietrich CP, Nader HB, Veiga SS, Gremski W. 2007b. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. *Biochimie* 89:289–300.
- de Souza AL, Malaque CM, Sztajnbock J, Romano CC, Duarte AJ, Seguro AC. 2008. Loxosceles venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. *Toxicon* 51:151–156.
- dos Santos LD, Dias NB, Roberto J, Pinto AS, Palma MS. 2009. Brown recluse spider venom: Proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. *Protein Pept Lett* 16:933–943.
- Feitosa L, Gremski W, Veiga SS, Elias MC, Graner E, Mangili OC, Brentani RR. 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36:1039–1051.
- Forrester LJ, Barrett JT, Campbell BJ. 1978. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: The role of sphingomyelinase D. *Arch Biochem Biophys* 187:355–365.
- França FO, Barbaro KC, Fan HW, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Tomy SC, Lopes MH, Warrell DA, Theakston RD. 2003. Envenoming by *Bothrops jararaca* in Brazil: association between venom antigenaemia and severity at admission to hospital. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97:312–317.
- Futrell JM. 1992. Loxoscelism. *Am J Med Sci* 304:261–267.
- Haase H, Hebel S, Engelhardt G, Rink L. 2009. Zinc ions cause the thimerosal-induced signal of fluorescent calcium probes in lymphocytes. *Cell Calcium* 45:185–191.
- Harris F, Phoenix DA. 1997. An investigation into the ability of C-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 to undergo membrane interaction. *Biochimie* 79:171–174.
- Kaestner L, Tabellion W, Weiss E, Bernhardt I, Lipp P. 2006. Calcium imaging of individual erythrocytes: Problems and approaches. *Cell Calcium* 39:13–19.
- Kalapothakis E, Chatzaki M, Goncalves-Dornelas H, de Castro CS, Silvestre FG, Laborne FV, de Moura JF, Veiga SS, Chavez-Olortegui C, Granier C, Barbaro KC. 2007. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. *Toxicon* 50:938–946.
- Kurpiewski G, Forrester LJ, Barrett JT, Campbell BJ. 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim Biophys Acta* 678:467–476.
- Kusma J, Chaim OM, Wille AC, Ferrer VP, Sade YB, Donatti L, Gremski W, Mangili OC, Veiga SS. 2008. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie* 90:1722–1736.
- Lang F, Gulbins E, Lang PA, Zappulla D, Foller M. 2010. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 26:21–28.
- Lee S, Lynch KR. 2005. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem J* 391:317–323.
- Luciano MN, da Silva PH, Chaim OM, dos Santos VL, Franco CR, Soares MF, Zanata SM, Mangili OC, Gremski W, Veiga SS. 2004. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. *J Histochem Cytochem* 52:455–467.
- Lung JM, Mallory SB. 2000. A child with spider bite and glomerulonephritis: A diagnostic challenge. *Int J Dermatol* 39:287–289.
- Machado LF, Laugesen S, Botelho ED, Ricart CA, Fontes W, Barbaro KC, Roepstorff P, Sousa MV. 2005. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxneogrin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics* 5:2167–2176.
- McDade J, Aygun B, Ware RE. 2010. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation leading to acute hemolytic anemia in six adolescents. *J Pediatr* 156:155–157.
- Mitsutake S, Igarashi Y. 2007. Transbilayer movement of ceramide in the plasma membrane of live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359:622–627.
- Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN. 2004. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 26:870–881.
- Murakami MT, Fernandes-Pedrosa MF, de Andrade SA, Gabdoulkhakov A, Betzel C, Tambourgi DV, Arni RK. 2006. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem Biophys Res Commun* 342:323–329.
- Murakami MT, Fernandes-Pedrosa MF, Tambourgi DV, Arni RK. 2005. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J Biol Chem* 280:13658–13664.
- Murray LM, Seger DL. 1994. Hemolytic anemia following a presumptive brown recluse spider bite. *J Toxicol Clin Toxicol* 32:451–456.
- Ochi S, Oda M, Matsuda H, Ikari S, Sakurai J. 2004. *Clostridium perfringens* alpha-toxin activates the sphingomyelin metabolism system in sheep erythrocytes. *J Biol Chem* 279:12181–12189.
- Ochi S, Oda M, Nagahama M, Sakurai J. 2003. *Clostridium perfringens* alpha-toxin-induced hemolysis of horse erythrocytes is dependent on Ca²⁺ uptake. *Biochim Biophys Acta* 1613:79–86.
- Oda M, Matsuno T, Shiihara R, Ochi S, Yamauchi R, Saito Y, Imagawa H, Nagahama M, Nishizawa M, Sakurai J. 2008. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J Lipid Res* 49:1039–1047.

- Oda M, Takahashi M, Matsuno T, Uoo K, Nagahama M, Sakurai J. 2010. Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta* 1798:1073–1080.
- Ohanian J, Ohanian V. 2001. Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci* 58:2053–2068.
- Ramos-Cerrillo B, Olvera A, Odell GV, Zamudio F, Paniagua-Solis J, Alagon A, Stock RP. 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* 44:507–514.
- Ribeiro RO, Chaim OM, da Silveira RB, Gremski LH, Sade YB, Paludo KS, Senff-Ribeiro A, de Moura J, Chavez-Olortegui C, Gremski W, Nader HB, Veiga SS. 2007. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 50:1162–1174.
- Spiegel A. 2003. Cell signaling. Beta-arrestin—Not just for G protein-coupled receptors. *Science* 301:1338–1339.
- Tambourgi DV, Goncalves-de-Andrade RM, van den Berg CW. 2010. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. *Toxicon* 56:1113–1119.
- Virtanen JA, Cheng KH, Somerharju P. 1998. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4964–4969.
- Williams ST, Khare VK, Johnston GA, Blackall DP. 1995. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. A report of two cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 104:463–467.
- Yang L, Andrews DA, Low PS. 2000. Lysophosphatidic acid opens a Ca^{++} channel in human erythrocytes. *Blood* 95:2420–2425.

Manuscript Number: TOXCON-D-11-00258

Title: Hemolytic activity of toxins from venomous animals: an overview

Article Type: Review Article

Keywords: Erythrocyte, Venom, Toxins, Hemolytic activity, Hemolysis

Corresponding Author: Dra. Daniele Chaves-Moreira, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Paraná

First Author: Daniele Chaves-Moreira, Ph.D.

Order of Authors: Daniele Chaves-Moreira; Larissa M Alvarenga; João Carlos D Muzzi; Juliana de Moura; Sílvia S Veiga.

Abstract: The majority of venomous and poisonous organisms are benign and environmentally beneficial. Their venoms are rich mixtures of molecules that are naturally involved in capturing, killing and digesting prey or for protection against predators. Occasionally, patients are envenomated after an accidental bite or contact with toxic venoms, and this can produce dangerous, painful lesions or significant systemic effects. Important clinical syndromes are produced by specimens from the phylum Arthropoda, specifically the classes Arachnida (spiders, scorpions), Insecta (bees, wasps and caterpillars) and marine species such as sea anemones and cnidarians. Serpents are also involved in important and sometimes lethal envenoming. These animals possess a wide variety of biologically active substances whose mechanisms of action are often unknown. This article will focus on the physiological hemolytic effects of toxins and crude venoms and their actions at the cellular level. An understanding of the mechanisms underlying the in vivo toxic effects of these substances will facilitate the development of more effective treatments against envenoming and aid the development of putative biotechnological applications. Bioactive molecules secreted by prokaryotic and eukaryotic organisms are important resources for bioprospection studies and for the development of technology related to therapeutic and health care products. This review will outline examples of such compounds and their activities.

Suggested Reviewers:

Liza Felicori

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

liza@icb.ufmg.br

Liza Felicori has expertise about hemolytic toxins and she has published articles about spider venom and hemolysis.

André Lopes Fuly

Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense.

andfuly@vm.uff.br

That researcher has expertise in studies about phospholipases from serpents and he could contribute with our article.

Kátia Bárbaro

Instituto Butantã

kbarbaro@butantan.gov.br

Dr. Barbaro was one of first researchers that studied the hemolytic effects from several venoms.

Gregor Anderluh

Departement of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

gregor.anderluh@bf.uni-lj.si

Dr. Anderluh has studied venom from anemonas that can cause hemolysis and, therefore, he can contribute with our article.

Carlos Álvarez

Universidad de La Habana

calvarez@fbio.uh.cu

Dr. Carlos works with sticholysins and pore forming proteins, both of them have hemolytic action. Because of his expertise, he could contribute with our work.

Hemolytic activity of toxins from venomous animals: an overview

**Daniele Chaves-Moreira^{a*}, Larissa Magalhães Alvarenga^b, João Carlos Degraf
Muzzi^b, Juliana de Moura^b, Silvio Sanches Veiga^a**

^aDepartamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil;

^bDepartamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

***Corresponding author:**

Daniele Chaves-Moreira

Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná

Setor de Ciências Biológicas, Caixa Postal 19040

Jardim das Américas, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil.

Fax: +55 41 3266 2042

E-mail: dani_chaves@ufpr.br

Keywords: Erythrocyte, Venom, Toxins, Hemolytic activity, Hemolysis.

ABSTRACT

The majority of venomous and poisonous organisms are benign and environmentally beneficial. Their venoms are rich mixtures of molecules that are naturally involved in capturing, killing and digesting prey or for protection against predators. Occasionally, patients are envenomated after an accidental bite or contact with toxic venoms, and this can produce dangerous, painful lesions or significant systemic effects. Important clinical syndromes are produced by specimens from the phylum Arthropoda, specifically the classes Arachnida (spiders, scorpions), Insecta (bees, wasps and caterpillars) and marine species such as sea anemones and cnidarians. Serpents are also involved in important and sometimes lethal envenoming. These animals possess a wide variety of biologically active substances whose mechanisms of action are often unknown. This article will focus on the physiological hemolytic effects of toxins and crude venoms and their

actions at the cellular level. An understanding of the mechanisms underlying the *in vivo* toxic effects of these substances will facilitate the development of more effective treatments against envenoming and aid the development of putative biotechnological applications. Bioactive molecules secreted by prokaryotic and eukaryotic organisms are important resources for bioprospection studies and for the development of technology related to therapeutic and health care products. This review will outline examples of such compounds and their activities.

CONTENTS

1. Introduction	2
2. History and epidemiology	5
3. Hemolytic Toxins and their Action Mechanisms	8
4. Toxins with phospholipase activity	10
4.1. Phospholipase A ₁	10
4.2. Phospholipase A ₂	11
4.3. Phospholipase B	15
4.4. Phospholipase C	17
4.5. Phospholipase D	19
5. Pore-forming toxins.....	22
5.1. Small Peptides	27
5.2. Toxins that modify ions channels	29
6. Perspectives	31
7. Acknowledgments	33
8. References	34

1. INTRODUCTION

Hemolytic disorders are characterized by signs of accelerated intravascular or extravascular erythrocyte destruction and vigorous blood regeneration. Intravascular hemolysis is accompanied by unique manifestations such as hemoglobinemia, hemoglobinuria, and hemosiderinuria that can culminate in renal failure (Goldfrank, 2009). Around the world, these disorders have been found in patients who were envenomated after a bite or contact with lytic venoms from single-celled microorganisms to multicellular metazoan animals.

Historically, the classic model used to study hemolytic toxins has been snake venom, and snake envenoming has been the cause of significant health problems worldwide (Warrell, 2002; Gutierrez et al., 2009a, b). Problems that develop following accidents with snake venom include intravascular bleeding due to the activation of clotting protein, hemolysis, hemoglobinemia, and hemoglobinuria. The intensity of symptoms varies with the severity of the accident and with species of serpent.

The mechanism of erythrocyte lysis related to snake bites involves phospholipases that are present in most venoms from snakes including cobras (Wasserman, 1988; Gutierrez et al., 2009c), Australian king brown snakes (Currie, 2004a, b), Tunisian saw-scaled (carpet) vipers (Gillissen et al., 1994), U.S. rattlesnakes (Biardi et al., 2006; Salazar et al., 2008), Habu snakes (Yamamoto et al., 2001), *Bothrops* snakes (Diaz et al., 2001; Lanari et al., 2010; de Oliveira et al., 2011) and, most significantly, from the several species of Russell vipers found throughout India and the rest of Asia (Nuchprayoon et al., 2001; Chakraborty et al., 2002; Kanjanabuch and Sitprija, 2008).

The phospholipase-D family of venoms is also responsible for the mechanism of intravascular hemolysis and most of the clinical symptoms related to the bite of a small brown spider from the *Loxosceles* genus, which is found mainly in South America and the southwestern part of the United States. The spider species implicated in these regions are the brown spiders *L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta* and *L. anomala* (South America) and *Loxosceles reclusa* (United States) (Senff-Ribeiro et al., 2008; Bucarechi et al., 2010; McDade et al., 2010).

Initially, the *Loxosceles* bite is painless and develops into an edematous necrotic lesion that may progress into an extensive, slowly healing, painful, gangrenous process and necrotic arachnidism (Futrell, 1992; Jackson et al., 1992; da Silva et al., 2004; Hogan et al., 2004). Some patients develop systemic manifestations that include intravascular hemolytic anemia within several hours to 5 days after being bitten. Hemoglobinuria and severe anemia are characteristic findings, and spherocytes, basophilic stippling, and leukocytosis are found in the blood. Thrombocytopenia has also been observed, and this is sometimes associated with diffuse intravascular coagulation (Veiga et al., 2000; de Souza et al., 2008; Tavares et al., 2011). Most often, the hemolytic episode subsides spontaneously in approximately 1 week, but occasionally, severe reactions occur that result in renal failure and death (Binder, 1989; De Roodt et al., 2002; Cabrerizo et al., 2009).

In some regions of the world, scorpions are a threat to public health. Although the mechanism is unknown, many species of scorpions, e.g., *Anuroctonus phaiodactylus* (Valdez-Cruz et al., 2004a, b, 2007) and *Hemiscorpius lepturus* (Pipelzadeh et al., 2006; Jalali et al., 2010), have been studied because of their ability to provoke erythrocyte lysis.

In Brazil, the scorpions responsible for human accidents belong to the genus *Tityus* and include *T. bahiensis*, *T. stigmurus* and *T. serrulatus*. Although *T. serrulatus* in Brazil and *Tityus trivittatus* in Argentina are considered the most poisonous of South American scorpions (Soares et al., 2002; de Roodt et al., 2009, 2010), there is no information about the hemolytic characteristics of their venom. On the other hand, components from the venom of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum* are similar to toxins from the *Heterometrus fulvipes* scorpion venom that can induce hemolysis (Schwartz et al., 2008).

In South America, the most medically important accidents occur with members from the order Lepidoptera (i.e., caterpillars) after contact with the first to sixth instar larvae. These caterpillar larvae cause hemostatic disturbances, and the mechanism of hemolysis is still not known. Severe hemorrhagic diseases are associated with the species *Lonomia obliqua* (lonomism) in southern Brazil, where it has been the cause of fatal accidents (Bochner and Hamid, 2003).

“Africanized” honeybee (*Apis mellifera*) accidents are also a problem around the world (Walls et al., 1983; Solley, 1990, 2002), including Brazil (Sandes et al., 2009). From 12 to 24 hours following a massive bee envenoming, asymptomatic patients may present with hemolysis, disseminated intravascular coagulation, thrombocytopenia, rhabdomyolysis, liver dysfunction, or renal failure (Stafford et al., 1989; Costa and Palma, 2000).

The bee venom contains melittin and phospholipase A₂, which together disrupt the erythrocyte membrane and cause hemolysis. Similarly, these symptoms and high hemolysis are found in accidents with social wasps, e.g., *Polybia paulista*, which are characterized as very aggressive and are endemic in Southeast Brazil (de Oliveira and Palma, 1998).

In the sea, hemolytic piscine venoms can be toxic for humans either by ingestion or by a sting from a fish. Studies indicate that this mechanism involves pore formation that is sometimes associated with the role of cationic amino acid residues (Maloy and Kari, 1995).

1 Sea snails, especially those from the genus *Conus*, are known for producing an
2 assembly of small hemolytic peptides, the conotoxins (Biggs et al., 2007, 2008, 2010).
3 Some conotoxins exhibit biochemical similarities to melittin (hemolytic bee toxin) and
4 appear to form pores in eukaryotic cell membranes and induce cell lysis, a classical
5 mechanism attributed to sea anemone and jellyfish toxins (Saravanan et al., 2010). Pore
6 formation is a possible mechanism for hemolysis that is caused by jellyfish venom,
7 although nonspecific cation channel formation is also a possibility (Edwards and
8 Dimmock, 2001).

9 When considering the subject of hemolysis, prokaryotes must also be included.
10 Although the major mechanism of cell lysis in prokaryotes is enzymatic and through the
11 action of phospholipase C and sphingomyelinases, studies indicate that the lysis caused
12 by some toxins appears to be related to Ca^{2+} uptake through T-type Ca^{2+} channels (Oda
13 et al., 2008b).

14 The purpose of this review is to provide a broad overview of the hemolytic
15 features of eukaryotic and prokaryotic venoms and the mechanisms involved in their
16 biochemical activities, concentrating on research that has been carried out in Brazil but
17 including studies from all over the world.

18 2. HISTORY AND EPIDEMIOLOGY

19 Since the earliest of times, human survival has been conditioned to co-exist with
20 venomous animals. Some of these animals have acquired synantropic characteristics,
21 and their envenomations have become a serious public health problem, especially in
22 tropical and subtropical countries.

23 Because of the weather in the Tropics, the dimensions of the continent and the
24 wide biological diversity of the area, envenomations have been a health problem since
25 the earliest times.

26 The first envenomings by poisonous animals in Brazil were reported in 1560 by
27 the Jesuit José Anchieta in a letter to his superior Priest Diego Laynes in Roma (Warrell
28 and Fenner, 1993). The problem continues today, likely due to environmental
29 imbalance, deforestation and global warming.

30 The true number for snake envenomings worldwide is not known, but it is
31 estimated that 421,000 cases occur each year, resulting in 20,000 deaths, and this does
32 not include people with sequelae (Kasturiratne et al., 2008). Although the global

number of envenomings by venomous animals is not known, in recent years, the Brazilian Health Ministry has obtained data on this issue.

In the last six years, the number of accidents involving venomous animals has increased by 32.7% across Brazil. In 2003, a total of 68,219 notifications were issued, whereas in 2009, the number was 90,558 cases. Until 2003, the number of accidents involving snakes (26,683) was predominant.

Curiously, since 2004, the number of cases of scorpionism has increased and surpassed the number of accidents involving other venomous animals; in 2009, more than 45,700 (50.5%) scorpion notifications were reported, followed by snake bites (22,763 cases), spider bites (18,687 cases) and caterpillar contact (3,387 cases).

Snake envenomings are particularly important due to their frequency and severity. The genus *Bothrops* is responsible for the vast majority of snakebites in South America. Up to 70% of venomous ophidian accidents in Brazil are due to *Bothrops* spp., followed by *Crotalus* spp. (7.4%), *Lachesis* spp. (3%) and *Micrurus* spp. (0.7%) (da Silva et al., 2003).

In southern Brazil, accidents with the brown spider (*Loxoscelim*) are predominant, with 76% of *Loxosceles* bites reported in Curitiba (Paraná State) and neighboring regions (Marques-da-Silva and Fischer, 2005; Fischer et al., 2009; Navarro-Silva et al., 2010).

Although *Loxosceles* bites have been recognized since 1891, data about their deleterious effects were not published until 1954 (Pauli et al., 2006). From 2007 to 2009, an annual average of 3,000 brown spider bites were reported in this region.

Different numbers are found in other regions of Brazil, where 80% of accidents that involve venomous animals such as snakes and scorpions occur in rural and urban areas, respectively.

Scorpions have adapted to the anthropic environment of Brazil. Although several species of scorpion are found in that country, the genus *Tityus* is the most important. The yellow scorpion, *Tityus serrulatus*, is of particular interest due to the toxicity of its venom and the increase in the number of reported cases. The fact of that this scorpion uses a form of reproduction that is independent of the male, i.e., parthenogenesis, may explain its expansion (Lourenco et al., 2008).

Within the Phylum Arthropoda, the Order Lepidoptera, which includes butterflies, moths and their caterpillars, concerns for public health authorities are mainly due to the ability of their venom to induce a lethal hemorrhagic syndrome. Problems

with caterpillars from the genus *Lonomia* have been more evident in South Brazil since 1989, when a high number of human cases were reported, particularly in Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, where accidents involving *Lonomia obliqua* were tracked and notified (Bochner and Hamid, 2003). In 2009, 4,089 accidents and five lethal cases involving these caterpillars were reported in Brazil.

In addition to hemorrhage, ecchymoses and hematomas are often seen and may be accompanied by bleeding from various sites. Crude *L. obliqua* bristle extract has been shown to induce hemolytic activity in human and rat erythrocytes (Seibert et al., 2003; Malaque et al., 2006); however, the mechanism is not known.

The medically important groups of Hymenoptera are Apoidea (bees), Vespoidea (wasps, hornets, and yellow jackets), and Formicidae (ants), who deliver their venom by stinging their victims. Hymenopterid stings and subsequent allergic reactions are a common indication for emergency room visits worldwide (Paudel and Paudel, 2009).

Although accidents with wasps are rare, they sometimes result in acute renal failure (ARF). ARF is typically caused by tubular necrosis in the setting of hemolysis or rhabdomyolysis. In some patients, renal failure may result from a direct nephrotoxicity of the wasp venom or acute interstitial nephritis from a hypersensitivity reaction (Pramanik and Banerjee, 2007; Das and Mukherjee, 2008).

In Brazil, envenomings by aquatic animals are not notifiable accidents, and the number of cases is not known.

On beaches, accidents with cnidarians are represented by several species along the coastline; however, few are noteworthy or of medical importance. The clinical manifestations of envenomings by cnidarians depend on the dermonecrotic, neurotoxic and hemolytic actions of the venom. Symptoms include plates or erythematous linear rounds and instantaneous local pain, which may cause nausea, vomiting, dyspnea, cardiac arrhythmias, acute pulmonary edema and death (Haddad et al., 2001, 2002, 2003, 2006, 2009).

Because of its large litoranean coast, almost all families and genera of poisonous fish have representatives in the seas and rivers of Brazil. All injuries by venomous fish cause pain of variable intensities, occasional necrosis and hemolysis. Accidents involving catfish (family Ariidae) are common in Brazil, but accidents with rays (several genera), scorpionfish (*Scorpaena*), toadfish (*Thalassophryne*), moray eels (*Gymnothorax*), spurdogs (*Squalus*) and others animals also occur.

Accidents involving marine and freshwater fish vary in severity: the pain caused by an accident with a stingray or scorpionfish is searing, whereas accidents involving catfish are less painful (Haddad et al., 2001, 2002, 2003, 2006).

Information of this nature is important for subsidizing the production and distribution of different types of serum (antivenom) around the country; for evaluating the location of the poles for the application of serum; for encouraging programs to train professionals to help prevent envenomings and to decrease the severity of accidents and the number of deaths; and finally, for mapping the locations of these animals in the environment.

3. HEMOLYTIC TOXINS AND THEIR MECHANISMS OF ACTION

In the world today, numerous marine animals, snakes, and arachnids are capable of envenoming humans (Singletary et al., 2005; Pernet et al., 2010). The knowledge of the type of venom involved in an accident can help physicians manage an envenoming. This is important because, depending on the aggressor organism, there are many different mechanisms of action.

Some toxins, e.g., Pompilidotoxins from *Anoplius samariensis*, are believed to destabilize cell membranes through interference with the sodium-potassium pump or by toxin oligomerization and subsequent pore formation on a cell membrane (Vecsey-Semjen et al., 2010). Other toxins such as phospholipases have a mechanism of action involving the hydrolysis of phospholipids in the cell membrane.

Damage to the erythrocyte membrane at the site of the bite is a common complication after accidents involving snakes. Numerous enzymes with hemolytic activity have been isolated from the venom of snakes, e.g., phospholipase A₂, phospholipase B and phospholipase C.

The phylum Arthropoda, specifically the classes Arachnida (spiders, scorpions, and ticks) and Insecta (bees, wasps, hornets, and ants), produce several toxins such phospholipase A₂, phospholipase C, phospholipases D and other small active peptides that can lyse erythrocytes (Sauter and Goldfrank, 1987; Owen et al., 1990; Goldfrank, 1992, 1999; Bryant, 2011).

Additionally, several bacteria produce phospholipases. According to Geny and Popoff (2006), some bacterial toxins, which are globally hydrophilic proteins, first interact with their target cells by recognizing a surface receptor, which could be a lipid, a lipid derivative or another compound but in a lipid environment.

Although bacterial protein toxins are essentially hydrophilic molecules, they interact with cell lipids during at least one step of their hemolytic action (Lemmon, 2008). After binding to a cell surface receptor, some toxins act directly on the cell membrane, whereas others enter into the cells and modify an intracellular target.

Many studies of animal toxins and their hemolytic activities have been conducted, and 234 reports have been published in the journal *Toxicon* in the last 10 years. Despite this body of work, the mechanism of action of many lytic types of venom remains unknown.

Figure 1 shows the percentage of research papers involving the mechanisms of action of hemolytic toxins that have been published in the journal *Toxin* in the last ten years. The toxins that have been studied most extensively are hemolytic toxins that contain phospholipase A₂ activity. This may be due to the many secretory organisms that produce phospholipase A₂ or because, compared to other toxins, venoms contain a large amount of phospholipase A₂. The following example illustrates this hypothesis: snakes that produce a large amount of venom have a large amount of PLA₂ that can be readily isolated and analyzed. In contrast, brown spiders produce a minimal volume of venom (approximately 4 µl) that contains a mixture of toxins, including phospholipase-D (PLD), which makes it much more difficult to isolate and study.

The second most studied hemolytic activity is that of the pore-forming toxins, in particular, the actinoporins, which interact with membranes that contain sphingomyelin or, in some cases, cholesterol. These toxins are important because of their involvement in human poisoning and the possibility of their application for the development of active molecules of pharmacological importance.

Studying these hemolytic toxins and elucidating their chemical structures and mechanisms of action will aid in the understanding of their molecular basis and will help to develop preventive measures, therapeutic methods and new biotechnological tools (Chaim et al., 2011b).

4. TOXINS WITH PHOSPHOLIPASE ACTIVITY

Phospholipases are a family of enzymes that hydrolyze ester bonds in phospholipids and are found in several biological sources including prokaryotic and higher organisms.

The phospholipases comprise two types: aliphatic esterases (A₁, A₂ and B) and phosphodiesterases (C and D) that release fatty acids and diacyl glycerol or

phosphatidic acid, respectively, when phosphatidylcholine is hydrolyzed. Figure 2 illustrates the various sites of hydrolysis provided by the respective phospholipases and the structure of a phospholipid. Using this information, we can predict the metabolite generated by the action of these phospholipases on phosphatidylcholine.

Some of phospholipases are of animal origin and will be discussed here due to their ability to induce hemolysis.

4.1. PHOSPHOLIPASE A₁

Several vespid phospholipases have been isolated and characterized biochemically and immunologically as allergens or enzymes that exhibit phospholipase A₁ (PLA₁) activity (King et al., 1984; Ho et al., 1986; Ho and Ko, 1988; Takasaki and Fukumoto, 1989). In urban areas of southeast Brazil, a very aggressive social wasp (*Polybia paulista*) that is responsible for many stinging accidents has been described. Cases of multiple stinging are generally followed by cases of severe hemolysis and myocardial dysfunction; in this situation, the symptoms described may be caused by PLA₁ (Yang et al., 2008; de Graaf et al., 2009).

Recently, eight forms of PLA₁ and two forms PLA₂ were identified in *P. paulista* venom using two-dimensional electrophoresis and tandem mass spectrometry. DNA sequence comparisons have shown that there is no homology between PLA₁ and PLA₂, suggesting that they have different mechanisms of action (dos Santos et al., 2007, 2010b).

Santos et al., (2007) purified three PLA₁ isoforms from *P. paulista* venom. The PLA₁ had hemolytic activity, although it was much less potent than PLA₁ purified from other vespid venoms, e.g., *Vespa verutina* and the lethal *Vespa basalis*.

PLA₁ from *Vespa verutina*, the verutoxins VT-1, VT-2a and VT-2b, were studied by Ho et al., (1999). The study revealed that these isoforms have high hemolytic activity and are highly lethal in mice.

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of PLA₁ from *Vespa basalis* venom revealed that this enzyme belongs to the α/β hydrolase fold, which is common to many lipases/esterases (Santos et al., 2007; Chou and Hou, 2008). Furthermore, studies indicate that these enzymes hydrolyze sn-1 fatty acids to produce 1-acyl-lysophosphatidic acid (LPA), a lipid mediator with multiple biological functions (Aoki, 2004; Baldini et al., 2005).

4.2. PHOSPHOLIPASE A₂

Phospholipase A₂ (PLA₂) is widely distributed in venoms from snakes, wasps, bees, scorpions, caterpillars and cnidarians.

PLA₂ enzymes secreted in snake and arthropod venoms are structurally related enzymes that have been associated with several toxic, pathological, or physiological processes (Gamborgi et al., 2006; Kowacs et al., 2006). This class of phospholipases is the most studied and best understood.

Snake venoms can exhibit diverse biological properties including hemolytic activity (Gutierrez and Lomonte, 1995; Kini, 2006). Hemolytic toxins are primarily found in the venoms from snakes of the Elapidae family, including the genus *Naja* (Condrea et al., 1980, 1981).

The main venom component responsible for hemolysis is thought to be PLA₂, which has direct toxicity for many tissues including the erythrocyte membrane (Atanasov et al., 2009; Jiang et al., 2011). The habu snake venom has additional activities; it activates complement and cleaves CD55 (the decay accelerating factor for complement) and CD59 (protects against the terminal complement membrane attack complex), thus increasing the susceptibility of the erythrocyte membrane to complement-induced lysis (Yamamoto et al., 2001).

Some reports have shown that PLA₂ is an important toxic element found in the venom of various snake species, including *Bothrops* sp. (Gutierrez and Lomonte, 1995; Lizano et al., 2000; Fox et al., 2006; Fox and Serrano, 2008; Montecucco et al., 2008). Curiously, an increase in PLA₂ activity was verified in the venoms of *Bothrops hyoprurus*, *B. erythromelas* and *B. moojeni*, which contain fewer proteases and are less lethal compared to venoms from other *Bothrops* species (Queiroz et al., 2008).

Crystallization, preliminary X-ray diffraction analysis and structural determination of a typical Asp-49 PLA₂ from *B. moojeni* venom (Nonato et al., 2001) demonstrated that this toxin is highly conserved and that the Asp-49 residue (together with three other residues: His48, Tyr52 and Asp99) may play an important structural role as part of the catalytic site of PLA₂ (Magro et al., 2009).

Two mechanisms of action of PLA₂ snake venom have been proposed (Scott et al., 1990; White et al., 1990; Rogers et al., 1996). In both mechanisms, His48 and Asp49 play essential roles in coordinating catalytic water molecules and mobilizing

Ca²⁺, respectively. Lys49-PLA₂ is catalytically inactive due to its incapacity to bind the cofactor Ca²⁺ (Holland et al., 1990; Scott et al., 1990; White et al., 1990).

The loss of catalytic activity in the PLA₂ homologues was initially attributed to the natural substitution Asp49Lys. The lysine in this position impairs Ca²⁺ coordination (Maraganore et al., 1984; Maraganore and Heinrikson, 1986; Arni and Ward, 1996; Ward et al., 1998), and other peculiarities have also been shown to be involved in this phenomenon (Lee et al., 2001; Ward et al., 2002; dos Santos et al., 2009, 2010a; 2011).

The hypothesis that other factors are involved is corroborated by the structural analysis of eight dimeric Lys49-PLA₂s showing that Lys122 interacts with Cys29 in both monomers of structures that present ligands in their hydrophobic channels. Furthermore, several biochemical studies demonstrated that Ca²⁺ is an obligatory cofactor for the catalysis of PLA₂ (Fernandes et al., 2010; Shimabuku et al., 2011).

Interestingly, *Bothrops* Asp49-PLA₂ exhibits a higher lytic activity on negatively charged liposomes (Diaz et al., 1991; Gutierrez and Lomonte, 1995; Angulo et al., 1997). Both the crude venom and purified PLA₂ from several species of the genus *Bothrops* induced indirect hemolysis *in vitro*. This effect can be partly explained by the hydrolysis of lecithins to lysolecithins and erythrocyte membrane lysis (Soares et al., 2001a, b; Saldarriaga et al., 2003; Ketelhut et al., 2003; Rodrigues et al., 2007; Garcia Denegri et al., 2010).

Studies by Díaz et al. (2001) of an enzymatically active PLA₂ from *Bothrops* spp. have shown that it can induce hemolysis in the presence of 0.5% BSA in calcium-containing medium (Quiros et al., 1992). The same author has shown that increments in the concentration of negatively charged phospholipids in the outer leaflet may increase the ability of PLA₂ to bind to the membrane by electrostatic interactions and to become susceptible to the membrane-disrupting activity (Diaz-Oreiro and Gutierrez, 1997; Diaz et al., 2001). However, Lys49-PLA₂ did not exhibit hemolytic activity. These results highlight the dependence of the hemolytic event on enzyme activity.

The phylum Arthropoda comprises several specimens that produce venoms with PLA₂ activity. In addition to being toxic to insects, heterodimeric PLA₂ from some scorpions causes hemolysis in mammalian erythrocytes as a consequence of the hydrolysis of the acyl ester bond of phospholipids and results in the formation of lysophospholipids and free fatty acids. An example of this is the PLA₂ from scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*, known as phaiodactylipin, which belongs to the class III PLA₂s. In addition to direct hemolytic activity *in vitro*, this toxin can cause a shape

alteration of erythrocytes known as crenation, i.e., the projection of spikes from the membrane core. Rupture or fragmentation of cell membranes (ghost-like shape) is not observed (Valdez-Cruz et al., 2004a, b, 2007).

PLA₂ is also a component of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum* venom. Unfortunately, its toxins have not been biologically characterized, and there are no data about their hemolytic effects. However, it is known that the N-terminal PLA₂ sequence is conserved and exhibits similarities to other arthropod phospholipases, including toxins from the *Heterometrus fulvipes* scorpion (Schwartz et al., 2008; Silva et al., 2009a).

H. fulvipes toxins can induce hemolysis in sheep erythrocytes, apparently by indirect activity, whereas crude venoms from other species such as *H. gravimanus* induced both direct and indirect hemolysis through PLA₂ activity (Fujimoto and Kaku, 1982).

Another venom with PLA₂ activity belongs to the caterpillar *Lonomia obliqua*, a medically important insect that is particularly venomous in its larval stages, which appear during Spring and Summer in Southern Brazil (Veiga et al., 2001). The caterpillar can cause severe and even fatal accidents following contact with the bristles where the venom is stored (Veiga et al., 2003; Veiga et al., 2005).

Accidents with *L. obliqua* frequently involve contact with colonies containing many caterpillars, which increases the clinical consequences and complicates the prognosis of the envenoming. The symptoms typically begin with a burning sensation at the point of contact, followed by erythema and edema. The skin around the site is warm to the touch. Headache, general discomfort, nausea, and vomiting may also occur (Alvarez Flores et al., 2010; Pinto et al., 2010).

However, one of most important actions of this venom is the intravascular hemolysis that can occur as soon as 1 h after envenomation (Seibert et al., 2004). The mechanism whereby this extract causes direct hemolysis is not known. According to a transcriptomic study performed by Veiga and colleagues (2005), the PLA₂ present in the bristles and hemolymphs could be related to the symptomatology.

PLA₂ (molecular mass, 15 kDa) was purified from *Lonomia obliqua* caterpillar bristles, and studies indicate that this toxin is an extracellular enzyme that requires Ca²⁺ for its catalytic activity. Its N-terminal sequence suggests that this toxin belongs to group III PLA₂ (Seibert et al., 2006).

The crude bristle extract obtained from *L. obliqua* exhibits direct hemolytic activity that is ascribed to PLA₂ and indirect hemolytic activity *in vitro* in the presence of lecithin. The exposure of phosphatidylserine was not noted in erythrocytes treated with the bristle extract, but an alteration in the fatty acid ratio in its membrane was observed (Seibert et al., 2010).

Another very aggressive arthropod is the wasp *Agelaia pallipes* found in Southeast Brazil (Baptista-Saidemberg et al., 2010). Although the quantities of venom produced by the insect are small, it has been shown that it contains many different components, one of which is PLA₂.

Some studies have demonstrated that PLA₂ is responsible for allergies caused by vespid venoms (Hoffman, 1985; Reisman and Osur, 1987; Castro et al., 1994). PLA₂ from *A. pallipes*, known as AgTX, exerts a potent hemolytic activity on mouse erythrocytes (direct hemolysis) that is dependent on Ca⁺² ions and is considered to be one of the most powerful hemolysins in animal venoms. AgTX exhibits a hemolytic activity that is 200 to 740 fold higher than polybitoxin and the PLA₂ found in *P. paulista* and *Apis mellifera* venom, respectively (Costa and Palma, 2000).

The PLA₂ present in bee (*A. mellifera*) venom is a typical member of the group III PLA₂ and represents approximately 12% of the dry weight of the venom (Dennis, 1997). This PLA₂ is present in three isoforms, with approximate molecular weights of 16, 18, and 20 kDa. The most studied of the isoforms is composed of 134 amino acids, with 5 disulfide bridges, 2 catalytic domains, and 3 calcium binding sites (Shen et al., 2002, 2010).

Bee venom at a concentration of 3 µg/mL is capable of completely lysing human erythrocytes (Watala and Kowalczyk, 1990). A serious envenoming caused by an attack by “Africanized” honey bees, *Apis mellifera scutellata*, was reported in São Paulo State, Brazil. The patient was stung approximately one thousand times and suffered intravascular hemolysis, respiratory distress, hepatic dysfunction, rhabdomyolysis, hypertension, myocardial damage and acute renal failure (França et al., 1994).

The danger is also present in the sea, where PLA₂ has been identified in several marine invertebrates (Nevalainen et al., 2004), although studies that correlate phospholipasic activity with hemolysis are scarce.

Studies of hemolytic PLA₂ isolated from the nematocysts of the sea anemone *Aiptasia pallida* have shown that this toxin requires a pH of 7.7 and Ca²⁺ for optimum catalytic activity (Grotendorst and Hessinger, 2000).

Calcium is also important for the hemolytic activity of toxins from the fire coral *Millepora complanata*. Hemolysis increased in the presence of Ca^{2+} and decreased in the presence of cholesterol. It is likely that the hemolysis caused by these toxins is due to PLA₂ activity because hemolysis is significantly reduced following incubation with PLA₂ inhibitors (Ibarra-Alvarado et al., 2007).

Based on the studies described above, Helmholz et al., (2007) proposed a possible relationship between the PLA₂ found in the tentacles of two jellyfish specimens, *Cyanea cappillata* and *C. lamarchii*, and the hemolytic effect exercised by their toxins (Helmholz et al., 2007).

At present, studying the bioprospection of natural toxins is popular, but the interest in PLA₂ is derived from its implication in mediating the inflammatory response through the release of arachidonic acid from the sn-2 position of phospholipids that are present in the plasma membrane (Rodriguez et al., 2002). Arachidonate is the precursor of the eicosanoid mediators of inflammation, which include leukotrienes, thromboxanes and prostaglandins (Haeggstrom et al., 2010; Shen et al., 2010). Furthermore, some lysophospholipids, e.g., lysophosphatidylcholine, can generate intracellular messengers that can interfere with cellular physiology (Anliker and Chun, 2004a, b).

4.3. PHOSPHOLIPASE B

Phospholipase B (PLB) is an enzyme that exhibits both PLA₁ and PLA₂ activities in that it can cleave acyl chains from both the sn-1 and sn-2 positions of a phospholipid, as shown in Figure 2.

Among the known phospholipases present in venoms, type B is the least studied and has been poorly characterized. Studies indicate that some snake venoms contain PLB, which can cause hydrolysis of phosphatidylcholine to fatty acids and glycerophosphorylcholine (Doery and Pearson, 1961, 1964; Shiloah et al., 1973).

Chromatographic analysis of Collett's snake (*Pseudechis colletti*), a member of the black snake genus that occurs in a region of Queensland, Australia (Isbister et al., 2006), showed that this venom possesses a PLB activity that acts on phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, but does not degrade sphingomyelin (Bernheimer et al., 1986).

A variety of symptoms have been reported following severe envenoming by Collett's snake, including hemolytic anemia (Isbister et al., 2006). *In vitro* studies indicate that *P. colletti* venom exerts a significant direct hemolytic effect on rabbit

erythrocytes. Purified PLB from *P. colletti* venom is presumably present in dimeric and monomeric forms and is strongly hemolytic for rabbit and human erythrocytes *in vitro*. Furthermore, ultrastructural changes are observed in the erythrocyte membrane. Curiously, PLB exerts no hemolytic activity on bovine or ovine erythrocytes (Bernheimer et al., 1987).

4.4. PHOSPHOLIPASE C

Phospholipase C (PLC) belongs to a class of enzymes that cleave phospholipids just before the phosphate group. Sphingomyelinase (SMase) is an enzyme that hydrolyses sphingomyelin (SM) to form ceramide and phosphocholine.

Several types of enzymes with PLC activity have been identified in pathogenic bacteria, e.g., *Staphylococcus aureus* (Projan and Archer, 1989), *Bacillus cereus* (Yamada et al., 1988), *Leptospira interrogans* (Segers et al., 1990), *Listeria ivanovii* (Gonzalez-Zorn et al., 1999) and *Clostridium perfringens* (Tso and Siebel, 1989). These bacterial toxins are active on the cell surface where they bind and recognize membrane phospholipids (Geny and Popoff, 2006). Some lipids and lipid derivatives (cholesterol, phosphatidylcholine and sphingolipid) are common receptors for many bacterial toxins.

The interaction between a toxin and its receptor is a key process for intoxication, i.e., the persistence of the toxin on the cell surface and enzymatic degradation of phospholipids (Labrie et al., 2001; Alouf and Muller-Alouf, 2003; Geny and Popoff, 2006; Smither et al., 2007).

S. aureus secretes a neutral sphingomyelinase called β -toxin. This molecule has a molecular mass of 35 kDa and appears to cause hot-cold hemolysis (Tajima et al., 2009), a phenomenon that occurs when the toxin degrades the membrane phospholipids at 37°C with posterior chilling. The hemolytic activity of β -toxin is specific for sheep erythrocytes, presumably due to the presence of relatively more sphingomyelin in the membrane of this cell. The cleavage of a phosphodiester bond uses the structural framework found in DNase I, an extended hydrophobic binding site for the fatty acid chains and a specific recognition of the choline head group (Huseby et al., 2007). However, it is not yet proven if the hemolysis is due to changes in the physical properties of the membrane or due to the production of the bioactive secondary messenger, ceramide (Hayashida et al., 2009).

Bacillus cereus is a gram-positive, spore-forming, facultative aerobe that causes opportunistic human infections (Oda et al., 2010). To date, it is known that *Bacillus*

cereus produces phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC), phosphatidylinositol-specific phospholipase, sphingomyelinase (Bc-SMase), and cereolysin O. Bc-SMase exerts hemolytic activity on sheep erythrocytes, likely due to their high sphingomyelin content (45 to 53%) and low phosphatidylcholine content (3 to 4%). It has been determined that the cooperative action of PC-PLC and Bc-SMase is required to lyse human erythrocytes, which contain almost ten times more phosphatidylcholine (31%) and two times less sphingomyelin (25%) than sheep erythrocytes (Pomerantsev et al., 2003).

Bc-SMase has a molecular mass of 34 kDa and exhibits both enzymatic activity and hemolytic activity (Ikezawa et al., 1980). Crystal analysis shows that Bc-SMase has two metal ion-binding sites, Mg^{2+} and Co^{2+} (Ago et al., 2006), that play important roles in the enzymatic activity of the molecule (Oda et al., 2010).

Additionally, SMase appears to be involved in a variety of cell regulation processes and in the reorganization of the cell membrane morphology (Chao et al., 2010), e.g., the formation of ceramide platforms in the plasma membrane due to the hydrolysis of sphingomyelin (SM) within lipid rafts. Recently, ceramide platforms have emerged as an important class of membrane domains that play a role in numerous biological pathways that include apoptotic signaling cascades and viral and bacterial infection (Bollinger et al., 2005; Silva et al., 2009b). Based on these observations, it has been determined that Bc-SMase is highly effective at binding and hydrolyzing SM in membranes, supporting the hypothesis that the hemolytic event is linked to this hydrolysis. Therefore, the treatment of sheep erythrocytes with Bc-SMase induces the formation of ceramide platforms in membranes. This results in a decrease in the fluidity of membranes, leading to destabilization under physical stimulation and finally the disruption of the membranes (Oda et al., 2010).

Clostridium perfringens is a toxin-producing anaerobic gram-positive bacillus well known for its role in human tissue infections and food poisoning (Murray et al., 2003). Infection by *C. perfringens* can be an unsuspected cause of hemolysis in emergency room patients (Boyd et al., 2009; Macias et al., 2009). The potent exotoxins produced by *C. perfringens* are central to their effectiveness as pathogens, and the major toxin produced by this bacteria is a PLC enzyme called α -toxin (Smedley et al., 2004). Intravascular hemolysis can be a life-threatening feature of severe *C. perfringens* infection.

The mechanism of erythrocyte membrane destruction appears to depend on α -toxin phospholipase activity (Ochi et al., 2004; Oda et al., 2008b; Boyd et al., 2009).

Site-directed mutagenesis and α -toxin crystallography studies of *C. perfringens* have shown that the active site includes two tightly bound zinc ions, which are coordinated to five histidines, one tryptophan, two aspartic acid and one glutamic acid residue (Nagahama et al., 1995, 1996, 1997, 2000). The α -toxin is composed of two domains; the N-terminal domain containing an active site for PLC and the C-terminal domain that binds α -toxin to membrane phospholipids in a calcium-dependent manner. The C-terminal domain of the toxin contains three Ca^{2+} binding sites (Eaton et al., 2002) and has no enzymatic activity but is required for its hemolytic and sphingomyelinase functions (Titball, 1993). Ca^{2+} appears to be essential for binding of the α -toxin to phospholipid monolayers (Moreau et al., 1988). This toxin can stimulate Ca^{2+} uptake through T-type Ca^{2+} channels (Ochi et al., 2003).

The *C. perfringens* α -toxin can induce the hot-cold hemolysis of horse erythrocytes and simultaneous hydrolysis of phosphatidylcholine to produce diacylglycerol and phosphorylcholine. The hemolytic activity of the α -toxin on rabbit erythrocytes is due to the activation of the metabolism of glycerophospholipids through a GTP-binding protein (Ochi et al., 1996, 2002).

The α -toxin induces hemolysis of rabbit and sheep erythrocytes through the activation of endogenous PLC via pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein G_i and through the activation of endogenous SMase, respectively (Ochi et al., 1996, 2002, 2003, 2004; Oda et al., 2008a).

The activation of C24:1-SM metabolism through the G_i protein in detergent-resistant membrane fractions of sheep erythrocytes and the formation of S1P (sphingosine-1-phosphate) are closely involved in hemolysis (Oda et al., 2008b, 2010). Studies have shown that C24:1 and C24:2 ceramides are metabolized to S1P by toxin-activated ceramidase, which selectively recognizes unsaturated ceramides as a substrate. The sphingosine that is generated is rapidly metabolized to S1P by the activated sphingosine kinase in sheep erythrocytes that have been treated with the toxin.

4.5. PHOSPHOLIPASE D

Brown spiders (*Loxosceles genus*) have a worldwide distribution, with different species present in South America, Central America, North America, Europe, Africa, Middle East, Oceania and Asia (Futrell, 1992; da Silva et al., 2004; Senff-Ribeiro et al.,

2008). The signs and symptoms of a brown spider (*Loxosceles* sp) bite are known as loxoscelism (da Silva et al., 2004).

In southern Brazil, loxoscelism is currently considered a serious public health problem, and *Loxosceles* bites affect approximately 3,000 people annually. *Loxosceles* is the third leading cause of accidents involving venomous animals in Brazil, where a widespread outbreak of *Loxosceles* envenomation and a high rate of domiciliary infestations have been reported (da Silva et al., 2004).

There are three species of *Loxosceles* that are commonly implicated in accidents involving brown spiders in Brazil: *L. gaucho*, *L. laeta*, and *L. intermedia*. Independent of species, the brown spider's venom can induce skin necrosis, rhabdomyolysis, hemolysis, coagulopathy, acute kidney injury, and systemic inflammatory response syndrome in humans (Cunha et al., 2003; Hogan et al., 2004; da Silva et al., 2004; Barbaro et al., 2005; Chaim et al., 2011a). Several case reports have described intravascular hemolysis following bites (Williams et al., 1995; de Souza et al., 2008).

A dramatic hemolytic process in human adults evidenced by hemoglobinuria, elevated unconjugated bilirubin and lactate dehydrogenase, and reticulocytosis has been reported. Clinically, this drastic devastation of erythrocytes is manifested by an intense reduction of hemoglobin, bloody urine and jaundice. Recently, another reported case showed a hemolytic process in an adolescent followed by loxoscelism that resulted in direct toxin-related erythrocyte damage and complement-mediated immune destruction, featuring both intravascular and extravascular hemolysis (McDade et al., 2010).

Studies showed that toxins from *L. intermedia* induce complement-dependent erythrocyte lysis (Tambourgi et al., 1995). The alternative complement pathway is activated by a cascade whereby endogenous metalloproteases induce the cleavage of surface erythrocyte glycoporphins (Tambourgi et al., 2000). Furthermore, these toxins can induce the activation of the classical complement pathway in erythrocytes, possibly by inducing the loss of membrane asymmetry, which allows the binding of C1q, followed by the activation of the classical pathway resulting in hemolysis (Tambourgi et al., 2010).

According to some early studies of brown spider venom effects such as hemolysis and dermonecrosis are caused by the major component of the venom, the sphingomyelinase D; this theory is based on its ability to hydrolyze sphingomyelin into choline and ceramide-1-phosphate (Futrell, 1992). However, studies based on lipid hydrolysis analysis following toxin treatments suggested that the term "phospholipase

D" (PLD) is more correct because members of this toxin family hydrolyze both sphingolipids and lysoglycerophospholipids, generating ceramide-1-phosphate or lysophosphatidic acid (Lee and Lynch, 2005; Chaim et al., 2011a).

Brown spider venom has a complex composition, and it is enriched with low molecular mass proteins ranging between 5 and 40 kDa. The total venom volume injected followed accidents is minute and contains on the order of ten micrograms of protein (Futrell, 1992; Sams et al., 2001; da Silva et al., 2004; Swanson and Vetter, 2005).

Some toxins present in the venom have been identified, and biological and biochemical studies are underway to examine the different isoforms of PLD, metalloproteases, serine proteases, hyaluronidase, and low molecular mass insecticidal peptides (da Silveira et al., 2007a; da Silveira et al., 2007b; da Silveira et al., 2007c; Ribeiro et al., 2007; Appel et al., 2008; Kusma et al., 2008; Chaves-Moreira et al., 2009; Gremski et al., 2010; Trevisan-Silva et al., 2010; Chaim et al., 2011a).

Evidence of a role for members of the phospholipase D family in hemolysis comes from experimental data using native and/or recombinant toxins (da Silva et al., 2004; Ribeiro et al., 2007). Using six isoforms of recombinant phospholipase D from *Loxosceles intermedia*, it has been determined that the hemolytic activity is dependent on the enzymatic activity (Chaves-Moreira et al., 2011).

The recombinant PLD crystal structure from *Loxosceles laeta* revealed that this toxin is a distorted (α/β)₈ barrel with the insertion of additional β -strands, α -helices, and several connecting loops (de Andrade et al., 2006; Murakami et al., 2006). The catalytic mechanism of PLD involves two histidine residues (His12 and His47), which are responsible for hydrolyzing phospholipids by an acid–base mechanism.

In this PLD, there is one Mg^{2+} ion that is coordinated tetrahedrally by three residues (Glu32, Asp34, and Asp91) and a single water molecule (Murakami et al., 2005, 2006). Studies indicate that, during degradation of phospholipid, the phosphate head group of the substrate is coordinated and stabilized by the Mg^{2+} ion (Murakami et al., 2005, 2006; de Santi Ferrara et al., 2009; Ullah et al., 2011).

Studies of the recombinant brown spider PLD LiRecDT1 (Chaim et al., 2006; Appel et al., 2008; de Oliveira Christoff et al., 2008; Kusma et al., 2008; Chaves-Moreira et al., 2009; Chaim et al., 2011a) compared its direct hemolytic activity to that of the mutated isoform LiRecDT1 H12A, which contains a substitution of His12 with Ala12 at the catalytic site that depletes the enzyme of hemolytic activity, and verified

that hemolytic activity is dependent on catalysis. It was also determined that *L. intermedia* crude venoms, LiRecDT1 and EGFP-LiRecDT1, can bind directly to the membranes of erythrocytes, thus inducing cell lysis (Chaves-Moreira et al., 2009).

A recent study indicated that LiRecDT1 binds sphingomyelin and cholesterol, which can explain how the toxin binds to erythrocyte membranes and corroborates the hemolytic activity (Chaim et al., 2011a).

The brown spider PLD can degrade ghost membrane and extract membrane from human red blood cells due to its interaction with phospholipids. In addition, a *L. intermedia* recombinant PLD causes lipid reorganization of erythrocyte membranes by the exposure of negatively charged phosphatidylserine at the cell surface and an apparent aggregation of lipid rafts (Chaves-Moreira et al., 2009).

Finally, it has been reported that LiRecDT1, but not LiRecDT1H12A, causes calcium influx in human erythrocytes in a time-dependent manner via an L-type calcium channel (Chaves-Moreira et al., 2011). These observations suggest that calcium influx, lipid mediators such as ceramide-1-phosphate or its metabolites and lysophosphatidic acid can activate several intracellular signaling cascades that may also contribute to hemolysis (Chaim et al., 2011b).

5. PORE-FORMING TOXINS

Several pore-forming toxins from diverse organisms such as virus (Fischer and Hsu, 2011), bacteria (Hunt et al., 2010), serpents (Wu et al., 2010), tarantula (Bohlen et al., 2010) and sea anemone (Garcia et al., 2009) have been described.

Pore-forming proteins exist in a stable water-soluble state or as an integral membrane pore and can undergo large conformational changes when converting between these states. These pore-forming toxins appear to adopt similar mechanisms for binding and inserting into biological membranes (Feil et al., 2010). Their mechanism of action can be summed up in four steps: first, the soluble monomeric proteins are released; second, the monomers bind to the target membrane; third, oligomerization of the toxins in a non-lytic pre-pore occurs; and fourth, the insertion of the transmembrane β -barrel into the lipid bilayer results in the opening of the pore (Parker and Feil, 2005; Viero et al., 2008).

The pore formation process appears to involve cholesterol binding (cholesterol-dependent cytolysins) (Gilbert, 2002).

Many of these toxins (more than 300) have been characterized, and at least one third of them acts by disrupting cell membranes, eventually leading to cell death (Alouf, 2001). Although there is much information about these toxins, only the pore-forming toxins from sea anemones will be addressed here.

Sea anemones secrete pore-forming toxins called actinoporins that have cytolytic effects and readily form pores in membranes that contain sphingomyelin (Bakrac and Anderluh, 2010).

There are at least 37 species of sea anemones distributed over seven different families: Actiniidae, Acontiophoridae, Aiptasiidae, Aliciidae, Metridiidae, Sagartiidae and Stichodactylidae (de Oliveira et al., 2006).

These marine animals are relatively abundant and are distributed along the Cuban seacoasts, the northern rocky coast of Spain, the Cantabrian Sea, the Bay of Biscay and the seas off the South American coast, from the Brazilian northeast down to Uruguayan waters (Anderluh and Macek, 2002; de Oliveira et al., 2006; Cilli et al., 2007; Zaharenko et al., 2008b; Bakrac and Anderluh, 2010).

Although *Bunodosoma caissarum* is a sea anemone endemic to Brazil and can induce hemolysis, actinoporins from two other animals, *Actinia equina* and *Stichodactyla helianthus*, which are found in Central and South America (Anderluh and Macek, 2002; Alvarez et al., 2009; Garcia et al., 2009), have been extensively studied and well characterized. These actinoporins, sticholysin (Stn) from *S. helianthus* and equinatoxin (Eqt) from *A. equine*, belong to a group of very similar basic cytolytic toxins that have a molecular mass of approximately 20 kDa and cause colloid-osmotic hemolysis (Alegre-Cebollada et al., 2007; Castrillo et al., 2010).

S. helianthus produces two highly hemolytic proteins, sticholysins I (StI) and II (StII), that have homology but have different hemolytic activities.

StI and StII are extremely efficient in generating rat, sheep, rabbit, and human erythrocyte hemolysis due to colloidal osmotic shock induced by the formation of pores in the membranes. As a result of the alteration of the osmotic gradient of molecules and the influx of water, the cell volume increases to the point of membrane disruption (Alvarez et al., 2009).

There are indications that the StII protein is approximately six times more active against human erythrocytes than StI (Alvarez et al., 2009). The structure of StII is based on a β -sandwich and is composed of ten β -strands that are flanked on each side by two α -helices comprising residues 14–23 and 128–135. The N-terminal α -helix corresponds

to the region responsible for trans-membrane pore formation (Gutierrez-Aguirre et al., 2004), and the C-terminal region interacts with strands $\beta 1$ and $\beta 2$ and with strands $\beta 7$ and $\beta 8$, respectively (Mancheno et al., 2003). StII contains a region enriched with aromatic amino acids such as Tyr106, Trp110, Try111, and Trp114 that are present in the loop between strands $\beta 6$ and $\beta 7$; amino acids Tyr131, Tyr135, and Tyr136 are present in helix $\alpha 2$ (Mancheno et al., 2003). Studies have shown that this region is hydrophobic and has affinity for the membrane interface (Killian and von Heijne, 2000).

The actinoporin pore formation mechanism is a conserved element that begins when the monomer binds to the membrane interface followed by the assembly of four monomers that culminate in the formation of a functional pore of approximately 2 nm in diameter (Tejuca et al., 1996; Mancheno et al., 2001; 2003). The inner lumen of the toroidal pore is likely formed by a combination of the hydrophilic faces of the α -helices of the toxin and the polar head of the membrane phospholipids (Alvarez et al., 2001, 2003, 2009).

According to crystallographic analysis on StII, aromatic residues such as Tyr107, Trp110, Tyr111, Trp114, Tyr131, Tyr135, and Tyr136, together with residues Ser54, Val87, Ser105, and Pro107, appear to be involved in the phosphorylcholine head groups of the membrane sphingomyelin binding site (Mancheno et al., 2001, 2003; Alegre-Cebollada et al., 2004; Alvarez et al., 2009). Moreover, it has been shown that StII Trp110 and Tyr111 are important residues involved in sphingomyelin recognition (Bakrac et al., 2008; Monastyrnaya et al., 2010).

Studies have shown that Ca^{+2} and Mg^{+2} increase the hemolytic activity of sticholysin II (StII), whereas Co^{+2} and Mn^{+2} inhibit this activity. Corroborating this finding, an increase in intracellular Ca^{+2} has been shown to increase StII lytic activity (Celedon et al., 2005). This same group concluded that the hemolytic mechanism, induced by the increase in intracellular Ca^{+2} concentrations, may activate scramblases and trigger membrane phospholipid translocation processes that promote an increase in StII membrane pore formation (Celedon et al., 2009).

Another anemone, *Actinia equine*, is a rich source of α -pore-forming toxins that contain amphipathic α -helices that act on ion channels. These toxins are contained within specialized stinging organelles (nematocysts) and serve as chemical weapons to capture prey and to defend against predators. The main toxin found in *Actinia equine* is an actinoporin, equinatoxin II (EqII), that has 179 residues and forms pores in erythrocytes (Drechsler et al., 2010).

EqtII differs from StII in its sequence and structure, but the mechanisms of toroidal pore formation in both toxins are similar. EqtII also contains a tightly folded hydrophobic β -sandwich core that is flanked on two sides by α -helices (Kristan et al., 2004; 2007; 2009).

Functional assays to test the direct binding of EqtII to the membrane showed that this activity is related to its sphingomyelin binding capacity. The hemolytic activity of EqtII is also highly sphingomyelin dependent (Anderluh et al., 2003; Bakrac et al., 2008; Schon et al., 2008; Bakrac and Anderluh, 2010).

EqtII and its recombinant analogues exert hemolytic activity on human erythrocytes as result of colloid-osmotic shock due to the opening of toxin-induced ionic pores (Kristan et al., 2004; 2007; 2009).

Bunodosoma caissarum is a sea anemone that secretes a variety of biological compounds and is found only in Brazilian coastal waters (Martins et al., 2009). The crude product extracted from their nematocysts exerts a high hemolytic activity on fish, frog, snake, mouse and rat erythrocytes (Malpezzi and Freitas, 1991). De Oliveira et al. (2006) have shown that a toxin isolated from *B. caissarum* venom, caissarolysin I (BcsI), possesses a higher hemolytic activity than EqtII. BcsI is a basic protein with a pI above 9.0 that appears to possess twice the hemolytic activity of EqtII. Although the mechanism of action of BcsI has not been demonstrated, it appears to act in a similar manner to actinoporins and forms pores in membranes (de Oliveira et al., 2006).

Interestingly, sea anemones are protected against the action of actinoporins by the absence of sphingomyelin in their membranes and by their phosphosphingolipids, which have an altered phosphorylcholine head group (Meinardi et al., 1995).

Because cnidarian venom (from jellyfish) is composed of a complex miscellany of molecules, most studies have been conducted with the crude venom instead of isolated proteins; further analysis is needed to identify the hemolytic activity of this venom.

Although different mechanisms have been proposed, the use of polyethylene glycol as an osmotic protectant to prevent water influx through the erythrocyte membrane indicates a possible pore-forming mechanism (Edwards et al., 2002; Marino et al., 2009).

Studies have demonstrated that jellyfish venoms from many different species exhibit variable intensities of hemolytic potency. It has been shown that sheep erythrocytes are sensitive to lysis by *Carybdea marsupialis* venom, whereas human and

1 rabbit cells are resistant to this venom (Rottini et al., 1995). In contrast, Torres and
 2 collaborators (2001) determined that human erythrocytes are more highly susceptible to
 3 *Cassiopea xamachana* jellyfish venom than sheep erythrocytes. A hemolytic potency
 4 evaluation of *Nemopilema nomurai* jellyfish venom on mammalian cells showed that
 5 human erythrocytes are at least six times more resistant to this venom than dog
 6 erythrocytes (Kang et al., 2009). The results indicate that the composition of erythrocyte
 7 membranes can influence the hemolytic activity of jellyfish venoms, thus supporting the
 8 proposal that the mechanism is enzymatic (Burnett and Calton, 1987). Studies from
 9 Helmholtz (2010) confirmed this hypothesis and showed that jellyfish venoms
 10 preferably bind to cholesterol and sphingomyelin when cell membrane lipids are
 11 immobilized as liposomes.

12 An important property of piscine venoms is that they demonstrate a strong
 13 hemolytic activity against erythrocytes of several species. Like most marine animals,
 14 the hemolytic mechanism of these venoms involves pore formation. Several species of
 15 fish possess substances that are potentially toxic to humans either by oral ingestion or
 16 by envenoming caused by a sting. Although these toxins rarely induce death, they are
 17 responsible for serious clinical cases that are found mainly in coastal regions (Church et
 18 al., 2003).

19 Although there are many different species of venomous fish, the venom activity
 20 is very similar in all. This may also be true of their structures, as indicated by their
 21 cross-reactivity with stonefish (*Synanceia trachynis*) antivenom in the treatment of
 22 human envenoming and from serological cross reactivity analysis (Church and
 23 Hodgson, 2002; Church et al., 2003).

24 Because stonefish (*Synanceia trachynis*, *S. horrida*, *S. verrucosa*, *S. nana* and *S.*
 25 *alula*) venom is relatively stable and can be isolated in considerable quantities, it is the
 26 most widely studied venom and is represented well in the literature. The protein lethal
 27 factor isolated from crude venom has been described for *Synanceja trachynis*
 28 (trachynilysin), *S. verrucosa* (verrucotoxin) and *S. horrida* (stonustoxin) (Khoo, 2002).

29 A report by Chen et al. (Chen et al., 1997) on the hemolytic activity of
 30 stonustoxin (SNTX) demonstrated the formation of a 2.5 to 3.2 nm pore. With a native
 31 molecular mass of 148 kDa, SNTX is one of the largest toxins that can form pores. The
 32 study also identified the role of cationic amino acid residues in hemolytic activity.
 33 Cationic amino acid residues such as lysine and arginine interact with the negatively
 34 charged membrane phospholipids that link the protein to the membrane, causing its

disruption (Maloy and Kari, 1995). Yew and Khoo suggest that tryptophan residues create a hydrophobic surface that is essential for pore formation (Yew et al., 1999; Yew and Khoo, 2000).

The characterization and cloning of STNX has been reported by Ghadessy et al. (1996), who showed that STNX has two subunits, a 71 kDa α subunit and a 79 kDa β subunit. The amino acid sequences of the subunits are 50% homologous and have a similarity of 70%, implying that they have evolved from a common ancestral gene.

Other hemolytic toxins that have been isolated from stonefish include verrucotoxin (VTX) and neoverrucotoxin (NeoVTX), both from *S. verrucosa*. VTX is a glycoprotein composed of 4 subunits, two α subunits each with a molecular mass of 83 kDa and two β subunits each with a molecular mass of 78 kDa; the total molecular mass of the entire native toxin is 322 kDa (Garnier et al., 1995). NeoVTX is a 166 kDa proteinaceous toxin composed of two subunits. The amino acid sequences of the NeoVTX α and β -subunits have 87 and 95% sequence homology with the STNX α - and β -subunits, respectively. When compared, the VTX β -subunit and the NeoVTX β -subunit have 90% sequence homology (Ueda et al., 2006).

It has been reported that crude venom from other fish species exhibits hemolytic activity. Shiomi et al. (1986, 1988, 1995, 2002, 2009) report that crude venom from the *Inimicus japonicus* scorpionfish and zebrafish (*Pterois lumulata*, *P. volitans*, *P. antennata* and *Dendrochirus zebra*) exhibit specific hemolytic activity for rabbit erythrocytes. However, the venom activity from these species can be neutralized by *S. trachynis* antivenom (Shiomi et al., 1986, 1988, 1995, 2002, 2009). Few studies have reported using isolated fractions from these species due to the difficulty associated with obtaining the venom and the problem of storing it without losing biological activity.

Lopes-Ferreira et al. (2000) reported a strong hemolytic activity in *Thalassophryne nattereri* fish venom. The authors fractionated the venom and determined that the fraction responsible for the biological activity corresponded to basic proteins with a molecular mass of 47 kDa. In this study, phospholipase activity was not found, and the specific mechanism of hemolysis was not analyzed.

5.1. SMALL PEPTIDES

Sea snails, especially those from the genus *Comus*, are known for producing an assembly of small peptides whose main activity is to block specific ion channels of

nerve and muscle cells (Saravanan et al., 2010). Accidents with these snails involving humans can potentially be fatal, with a mortality rate of 25% (Haddad, 2006).

Conotoxins appear to have similar biochemical properties; all are monomeric proteins with a low molecular mass (an average of between 10 and 43 kDa) (Saravanan et al., 2010). Some of these toxins have been described as hemolytic for human erythrocytes, e.g., conolysin Mt isolated from *C. mustelinus*, three conotoxins isolated from *C. fugilinus* and echotoxins isolated from *Monoplex echo* (Shiomi et al., 2000).

Conolysin Mt is a highly hemolytic toxin that causes 40% hemolysis at a concentration of 1 μ M and more than 90% hemolysis at a concentration of 10 μ M in human erythrocytes. There are two peptides present in this toxin: conolysin Mt1 and conolysin Mt2, with an average molecular mass of approximately 2.7 kDa. Mt1 has the amino acid sequence FHPSLWVLIPQYIQLIRKILKSG, and Mt2 has the amino acid sequence FHPSLWVLIPQYIQLIRKILKS. Conolysin Mt1 and Mt2 show some similarities to the C-terminal α -helix of melittin (hemolytic bee toxin) and appear to form pores in eukaryotic cell membranes (Biggs et al., 2007).

Conotoxins isolated from *C. fugilinus* that have a low molecular mass (below 14 kDa) demonstrate a hemolytic mechanism similar to the pore formation mechanism of sea anemone toxins (Saravanan et al., 2010). However, echotoxins (25 kDa) from *Monoplex echo* appear to use a different mechanism of action, and the hemolytic activity of these toxins is inhibited by gangliosides, which suggests that they lyse erythrocytes through binding to gangliosides receptors (Shiomi et al., 2000).

Honeybee (*Apis mellifera*) venom contains the well-known peptides melittin, apamin, tertiapin, secapin, and MCD peptide. Some of these peptides exert a detergent-like action on plasma membranes (Dawson et al., 1978), causing cell lysis, whereas others are neurotoxins. Most of these peptides have polycationic amphipathic components and have a high content of α -helices in their secondary structures; these peptides generally account for cell lysis, hemolysis, antibiosis and sometimes promote the delivery of cellular activators/mediators (Kastin and Pan, 2006).

Melittin is an active small amphiphilic peptide with a predominantly hydrophobic N-terminal region and a hydrophilic C-terminal region that can form transmembrane pores (Raghuraman and Chattopadhyay, 2006).

Figure 3 summarizes all of the hemolytic mechanisms that have been discussed above.

5.2. TOXINS THAT MODIFY ION CHANNELS

Peptide toxins are positively charged, relatively small and modify the processes of ion channel activation and inactivation without altering ion selectivity (Strichartz et al., 1987). Some lipophilic toxins can act from either side of the membrane and modify all the functions of cation channels. Information about these toxins is scarce, but their mechanisms of action are very interesting, some of which are discussed below.

Staphylococcus aureus α -toxin forms pores in the cellular membrane and results in significantly stronger hemolysis of knockout cells (KCa3.1^{-/-}) compared to wild-type erythrocytes. Studies from Foller et al., (2010) indicate that KCa3.1 channel activity and the Gardos effect can counteract the hemolysis of injured erythrocytes, thus decreasing hemoglobin release into the circulating blood.

Moreover, α -hemolysin from *Escherichia coli* triggers the activation of the P2X purinergic receptor (and possibly pannexins channels) in equine, murine, and human erythrocytes, increasing hemolysis (Iglesias et al., 2009). α -Hemolysin-stimulated hemolysis is reportedly preceded by an increase in intracellular calcium, which induces scramblases to translocate phospholipids from the lipid bilayer of the cell membrane, Ca^{2+} -stimulated activation of Gardos K^+ and TMEM16A Cl^- channels, which culminates in erythrocyte shrinkage and cell lysis (Skals et al., 2009).

Hymenopteran venoms may also contain some neurotoxins that affect both the vertebrate and invertebrate nervous systems by blocking sodium channel inactivation (Sahara et al., 2000). In addition, some of these toxins target Na^+ and/or Ca^{2+} channels or even the nicotinic ACh receptor (Kastin and Pan, 2006), similar to the pompilidotoxins (PMTXs).

PMTXs constitute a family of toxins with 13 amino acid residues that have been isolated from the venoms of *Anoplius samariensis* (Hisada et al., 2002) and *Batozonellus maculifrons* (Konno et al., 2000).

Anoplin is a major toxin in the venom of *Anoplius samariensis* (Harsch et al., 1998) and constitutes an amphiphilic α -helical peptide that causes mast cell degranulation and has hemolytic and antimicrobial activities (Konno et al., 2001). Notably, this toxin discriminates between neuronal and cardiac sodium channels (Kinoshita et al., 2001).

Other toxins with powerful hemolytic activity are the polypeptides from sea anemones that affect sodium and potassium channels (Karlsson et al., 1991b; Llewellyn and Norton, 1991; Norton, 1991). Studies suggest that the venom of the sea anemone

Bunodosoma cangicum contains two types of neuroactive substance, one that modulates Na^+ channels and one that blocks K^+ channels, with an overall effect on the prolongation of nerve action potential. Other data reported by Araque et al. (Araque et al., 1995) demonstrate that the venom obtained from the same anemone includes a toxin that selectively blocks Ca^{2+} -dependent K^+ currents in a reversible manner without modifying Na^+ currents. Moreover, Harvey et al. (Harvey et al., 1996) demonstrated that the *B. cangicum* venom blocks the binding of labeled DTX (a known K^+ channel blocker) in synaptosomal preparations. These pharmacological activities, illustrated in Figure 4, can induce hemolysis in erythrocytes.

6. PERSPECTIVES

In ancient Greece, Aristotle recognized the biological potential of toxins from venomous animals, and crude venom was used for medicinal purposes (Lucas, 1988; Hawgood, 1992).

Today, the great diversity of toxins from eukaryotic and prokaryotic organisms is an entire universe yet to be explored. The different mechanisms and pharmacological effects of these toxins need further study for the advancement of several fields, e.g., new treatment strategies could be developed to improve accident management. The number of lethal snakebite cases decreased 10 to 50 fold between the 19th and 20th centuries in North America, and this is one of the motives for the continued study of antivenoms (Gold et al., 2004). This progress demonstrates how the development of new techniques can result in considerable improvements in the treatment of venomous animal accidents.

Further studies of these toxins would be useful not only to help improve the correct treatment of accidents but also for the development of new technologies. These toxins are reservoirs of natural compounds that have been recognized as promising resources for biomedical applications in the pharmaceutical field, in neural and biological sciences, in the biotechnology industry and in the development of novel drugs.

Because of the drastic effects triggered by these toxins, the topics presented in this review illustrate the importance of continuing the study of hemolytic proteins and uncovering the potential of their unexplored and unsuspected biological and biotechnological activities.

Recently, molecular biology techniques have helped to characterize different toxins and have allowed a deeper insight into their molecular actions. A greater

1 understanding of toxin mechanics and their potential for use as drugs will depend upon
2 insight into their biochemical classification, determination of their structure and
3 conformation, and the elucidation of their biological activities based on their molecular
4 organization, their cellular receptors and their mode of action in different cell types
5 (Senff-Ribeiro et al., 2008; Chaim et al., 2011b). A better understanding of the action
6 and structure of toxins has also allowed the development of inhibitors that have the
7 potential to be used to design new drugs. Studies by Soares and Giglio (Soares and
8 Giglio, 2003) have shown that the PLA₂ inhibitors have anti-myotoxic, anti-edema, anti-
9 cytotoxic and anti-bacterial activities, suggesting a role for these inhibitors in
10 biomedicine.
11

12 The use of natural enzymes can also be of great value in the food industry. The
13 industrial processing of oil and cheese and the baking industry have all used
14 phospholipases. These enzymes are usually used to produce emulsifier-like molecules
15 (i.e., lysolecithin and monoglycerides) by acting on the phospholipids already present in
16 the ingredients used in the production of mayonnaise and sauces (De Maria et al., 2007).
17

18 The possibility of biotechnological applications for these toxins justifies the
19 continued investigation of these toxin-producing organisms, especially when the vast
20 molecular biodiversity and complexity of their venoms are taken into consideration.
21 Hemolytic activity, which can be measured by a very simple and sensitive assay for
22 most membrane damaging toxins, has been the most commonly used procedure to
23 assess and characterize the activity of some toxins.
24

25 A successful example of reconciling research and the applicability of toxins has
26 been the elucidation of the mechanism of action of actinoporins. The discovery that
27 actinoporins specifically bind to regions that are rich in sphingomyelin and trigger the
28 formation of pores in the cell membrane is useful for understanding the cellular
29 phenomena that result from this toxin and for developing new biotechnological tools,
30 e.g., actinoporins are being used for the selective killing of cancer cells (Panchal et al.,
31 2002; Sepcic et al., 2003) and in biosensor technologies (Astier et al., 2005).
32

33 In conclusion, the study of poisonous and venomous organisms is extremely
34 important for the identification of their venomous compounds and the characterization
35 of their modes of action, with the aim being to develop their application as bioactive
36 substances and to improve treatments. For this purpose, novel scientific models and
37 further research are needed to evaluate this invaluable and inexhaustible source of
38 possibilities.
39

7. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, CNPq and CAPES, Brazil.

8. LEGENDS

Figure 1: Percentage of studies on hemolytic toxins published by the journal *Toxicon* in the last ten years. Note: The search was carried out using the advanced search from the Science Direct website with the key words hemolysis and toxin.

Figure 2: Simplified view of phospholipids and the target sites for phospholipases. Note: this figure was produced using Servier Medical Art (<http://www.servier.com>).

Figure 3: Overview of hemolytic toxins.
Note: this figure was produced using Servier Medical Art (<http://www.servier.com>).

Figure 4: Simplified view of the cytotoxicity caused by ion channel cascade modification in erythrocytes. Pompilidotoxins (PMTXs) appear to modulate Na⁺ channels and promote cell swelling by the entry of water and disruption of the membrane. Other toxins, such as α -hemolysin from *E. coli*, induce Ca⁺⁺ influx, which in turn activates scramblases, triggers the activation of the Gardos channel, inducing K⁺ efflux, and leads to erythrocyte shrinkage and hemolysis. Note: this figure was produced using Servier Medical Art (<http://www.servier.com>).

9. REFERENCES

- Ago, H., Oda, M., Takahashi, M., Tsuge, H., Ochi, S., Katunuma, N., Miyano, M., Sakurai, J., 2006. Structural basis of the sphingomyelin phosphodiesterase activity in neutral sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *J Biol Chem* 281, 16157-16167.
- Alegre-Cebollada, J., Lacadena, V., Onaderra, M., Mancheno, J.M., Gavilanes, J.G., del Pozo, A.M., 2004. Phenotypic selection and characterization of randomly produced non-haemolytic mutants of the toxic sea anemone protein sticholysin II. *FEBS Lett* 575, 14-18.
- Alegre-Cebollada, J., Onaderra, M., Gavilanes, J.G., del Pozo, A.M., 2007. Sea anemone actinoporins: the transition from a folded soluble state to a functionally active membrane-bound oligomeric pore. *Curr Protein Pept Sci* 8, 558-572.

- Alouf, J.E., 2001. Pore-forming bacterial protein toxins: an overview. *Curr Top Microbiol Immunol* 257, 1-14.
- Alouf, J.E., Muller-Alouf, H., 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* 292, 429-440.
- Alvarez, C., Casallanovo, F., Shida, C.S., Nogueira, L.V., Martinez, D., Tejuca, M., Pazos, I.F., Lanio, M.E., Menestrina, G., Lissi, E., Schreier, S., 2003. Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces--modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. *Chem Phys Lipids* 122, 97-105.
- Alvarez, C., Mancheno, J.M., Martinez, D., Tejuca, M., Pazos, F., Lanio, M.E., 2009. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon* 54, 1135-1147.
- Alvarez, C., Pazos, I.F., Lanio, M.E., Martinez, D., Schreier, S., Casallanovo, F., Campos, A.M., Lissi, E., 2001. Effect of pH on the conformation, interaction with membranes and hemolytic activity of sticholysin II, a pore forming cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39, 539-553.
- Alvarez Flores, M.P., Zannin, M., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2010. New insight into the mechanism of *Lonomia obliqua* envenoming: toxin involvement and molecular approach. *Pathophysiol Haemost Thromb* 37, 1-16.
- Anderluh, G., Dalla Serra, M., Viero, G., Guella, G., Macek, P., Menestrina, G., 2003. Pore formation by equinatoxin II, a eukaryotic protein toxin, occurs by induction of nonlamellar lipid structures. *J Biol Chem* 278, 45216-45223.
- Anderluh, G., Macek, P., 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40, 111-124.
- Angulo, Y., Chaves, E., Alape, A., Rucavado, A., Gutierrez, J.M., Lomonte, B., 1997. Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A2 from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. *Arch Biochem Biophys* 339, 260-266.
- Anliker, B., Chun, J., 2004a. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol* 15, 457-465.
- Anliker, B., Chun, J., 2004b. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 279, 20555-20558.
- Aoki, J., 2004. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol* 15, 477-489.
- Appel, M.H., da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Paludo, K.S., Silva, D.T., Chaves, D.M., da Silva, P.H., Mangili, O.C., Senff-Ribeiro, A., Gremski, W., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2008. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim Biophys Acta* 1780, 167-178.
- Araque, A., Urbano, F.J., Cervenansky, C., Gandia, L., Buno, W., 1995. Selective block of Ca(2+)-dependent K⁺ current in crayfish neuromuscular system and chromaffin cells by sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom. *J Neurosci Res* 42, 539-546.
- Arni, R.K., Ward, R.J., 1996. Phospholipase A2--a structural review. *Toxicon* 34, 827-841.
- Astier, Y., Bayley, H., Howorka, S., 2005. Protein components for nanodevices. *Curr Opin Chem Biol* 9, 576-584.
- Atanasov, V.N., Danchev, D., Mitewa, M., Petrova, S., 2009. Hemolytic and anticoagulant study of the neurotoxin vipoxin and its components--basic phospholipase A2 and an acidic inhibitor. *Biochemistry (Mosc)* 74, 276-280.

- Bakrac, B., Anderluh, G., 2010. Molecular mechanism of sphingomyelin-specific membrane binding and pore formation by actinoporins. *Adv Exp Med Biol* 677, 106-115.
- Bakrac, B., Gutierrez-Aguirre, I., Podlesek, Z., Sonnen, A.F., Gilbert, R.J., Macek, P., Lakey, J.H., Anderluh, G., 2008. Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *J Biol Chem* 283, 18665-18677.
- Baldini, P.M., De Vito, P., Vismara, D., Bagni, C., Zalfa, F., Minieri, M., Di Nardo, P., 2005. Atrial natriuretic peptide effects on intracellular pH changes and ROS production in HEPG2 cells: role of p38 MAPK and phospholipase D. *Cell Physiol Biochem* 15, 77-88.
- Baptista-Saidemberg, N.B., Saidemberg, D.M., de Souza, B.M., Cesar-Tognoli, L.M., Ferreira, V.M., Mendes, M.A., Cabrera, M.P., Ruggiero Neto, J., Palma, M.S., 2010. Protonectin (1-6): a novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. *Toxicon* 56, 880-889.
- Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C., Winkel, K., 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45, 489-499.
- Bernheimer, A.W., Linder, R., Weinstein, S.A., Kim, K.S., 1987. Isolation and characterization of a phospholipase B from venom of Collett's snake, *Pseudechis colletti*. *Toxicon* 25, 547-554.
- Bernheimer, A.W., Weinstein, S.A., Linder, R., 1986. Isoelectric analysis of some Australian elapid snake venoms with special reference to phospholipase B and hemolysis. *Toxicon* 24, 841-849.
- Biardi, J.E., Chien, D.C., Coss, R.G., 2006. California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) defenses against rattlesnake venom digestive and hemostatic toxins. *J Chem Ecol* 32, 137-154.
- Biggs, J.S., Olivera, B.M., Kantor, Y.I., 2008. Alpha-conopeptides specifically expressed in the salivary gland of *Conus pulicarius*. *Toxicon* 52, 101-105.
- Biggs, J.S., Rosenfeld, Y., Shai, Y., Olivera, B.M., 2007. Conolysin-Mt: a conus peptide that disrupts cellular membranes. *Biochemistry* 46, 12586-12593.
- Biggs, J.S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J.P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Moreno, K.J., Bernaldez, J., Licea-Navarro, A., Corneli, P.S., Olivera, B.M., 2010. Evolution of *Conus* peptide toxins: analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Mol Phylogenet Evol* 56, 1-12.
- Binder, L.S., 1989. Acute arthropod envenomation. Incidence, clinical features and management. *Med Toxicol Adverse Drug Exp* 4, 163-173.
- Bochner, B.S., Hamid, Q., 2003. Advances in mechanisms of allergy. *J Allergy Clin Immunol* 111, S819-823.
- Bohlen, C.J., Priel, A., Zhou, S., King, D., Siemens, J., Julius, D., 2010. A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain. *Cell* 141, 834-845.
- Bollinger, C.R., Teichgraber, V., Gulbins, E., 2005. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1746, 284-294.
- Boyd, S.D., Mobley, B.C., Regula, D.P., Arber, D.A., 2009. Features of hemolysis due to *Clostridium perfringens* infection. *Int J Lab Hematol* 31, 364-367.
- Bryant, S.M., 2011. Book Review Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 9th ed. , by Lewis S. Nelson , Neal A. Lewin , Mary Ann Howland , Robert S. Hoffman , Lewis R. Goldfrank , Neal E. Flomenbaum , New York , McGraw-Hill , 2010 1968 pp., \$259.00 (hardback), 0071605932/9780071605939. *Clin Toxicol (Phila)* 49, 195-196.

- Bucaretychi, F., De Capitani, E.M., Hyslop, S., Sutti, R., Rocha-e-Silva, T.A., Bertani, R., 2010. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles anomala*. *Clin Toxicol (Phila)* 48, 764-765.
- Burnett, J.W., Calton, G.J., 1987. Jellyfish envenomation syndromes updated. *Ann Emerg Med* 16, 1000-1005.
- Cabrerizo, S., Docampo, P.C., Cari, C., Ortiz de Rozas, M., Diaz, M., de Roodt, A., Curci, O., 2009. [Loxoscelism: report of a viscerocutaneous case with favorable resolution]. *Arch Argent Pediatr* 107, 256-258.
- Castrillo, I., Araujo, N.A., Alegre-Cebollada, J., Gavilanes, J.G., Martinez-del-Pozo, A., Bruix, M., 2010. Specific interactions of sticholysin I with model membranes: an NMR study. *Proteins* 78, 1959-1970.
- Castro, F.F., Palma, M.S., Brochetto-Braga, M.R., Malaspina, O., Lazaretti, J., Baldo, M.A., Antila, M.A., Zuppi, L.J., Croce, J., Cossermelli, W., 1994. Biochemical properties and study of antigenic cross-reactivity between Africanized honey bee and wasp venom. *J Investig Allergol Clin Immunol* 4, 37-41.
- Celedon, G., Gonzalez, G., Lissi, E., Cerda, T., Martinez, D., Soto, C., Pupo, M., Pazos, F., Lanio, M.E., Alvarez, C., 2009. Effect of calcium on the hemolytic activity of *Stichodactyla helianthus* toxin sticholysin II on human erythrocytes. *Toxicon* 54, 845-850.
- Celedon, G., Venegas, F., Campos, A.M., Lanio, M.E., Martinez, D., Soto, C., Alvarez, C., Lissi, E., 2005. Role of endogenous channels in red blood cells response to their exposure to the pore forming toxin Sticholysin II. *Toxicon* 46, 297-307.
- Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V.P., Sade, Y.B., Boia-Ferreira, M., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Takahashi, H.K., Toledo, M.S., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2011a. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1811, 84-96.
- Chaim, O.M., Sade, Y.B., da Silveira, R.B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chavez-Olortegui, C., Mangili, O.C., Gremski, W., von Dietrich, C.P., Nader, H.B., Sanches Veiga, S., 2006. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 211, 64-77.
- Chaim, O.M., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A.C.M., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Mangili, O.C., Silveira, R.B.d., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2011b. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. *Toxins* 3, 309-344.
- Chakraborty, A.K., Hall, R.H., Ghose, A.C., 2002. Purification and characterization of a potent hemolytic toxin with phospholipase A2 activity from the venom of Indian Russell's viper. *Mol Cell Biochem* 237, 95-102.
- Chao, L., Gast, A.P., Hatton, T.A., Jensen, K.F., 2010. Sphingomyelinase-induced phase transformations: causing morphology switches and multiple-time-domain ceramide generation in model raft membranes. *Langmuir* 26, 344-356.
- Chaves-Moreira, D., Chaim, O.M., Sade, Y.B., Paludo, K.S., Gremski, L.H., Donatti, L., de Moura, J., Mangili, O.C., Gremski, W., da Silveira, R.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2009. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J Cell Biochem* 107, 655-666.
- Chaves-Moreira, D., Souza, F.N., Fogaca, R.T., Mangili, O.C., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2011. The relationship between Calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. *J Cell Biochem*.

- Chen, D., Kini, R.M., Yuen, R., Khoo, H.E., 1997. Haemolytic activity of stonustoxin from stonefish (*Synanceja horrida*) venom: pore formation and the role of cationic amino acid residues. *Biochem J* 325 (Pt 3), 685-691.
- Chou, C.C., Hou, M.H., 2008. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of phospholipase A1 isolated from hornet (*Vespa basalis*) venom. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 64, 1118-1120.
- Church, J.E., Hodgson, W.C., 2002. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon* 40, 1083-1093.
- Church, J.E., Moldrich, R.X., Beart, P.M., Hodgson, W.C., 2003. Modulation of intracellular Ca^{2+} levels by Scorpaenidae venoms. *Toxicon* 41, 679-689.
- Cilli, E.M., Pigossi, F.T., Crusca, E., Jr., Ros, U., Martinez, D., Lanio, M.E., Alvarez, C., Schreier, S., 2007. Correlations between differences in amino-terminal sequences and different hemolytic activity of sticholysins. *Toxicon* 50, 1201-1204.
- Condrea, E., Rapuano, B.E., Fletcher, J.E., Yang, C.C., Rosenberg, P., 1981. Effects of arginine modification of *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipases A2 on enzymatic activity, lethality and anticoagulant action. *Toxicon* 19, 721-725.
- Condrea, E., Yang, C.C., Rosenberg, P., 1980. Comparison of a relatively toxic phospholipase A2 from *Naja nigricollis* snake venom with that of a relatively non-toxic phospholipase A2 from *Hemachatus haemachatus* snake venom--I. Enzymatic activity on free and membrane bound substrates. *Biochem Pharmacol* 29, 1555-1563.
- Costa, H., Palma, M.S., 2000. Agelotoxin: a phospholipase A(2) from the venom of the neotropical social wasp *cassununga* (*Agelaia pallipes pallipes*) (Hymenoptera-Vespidae). *Toxicon* 38, 1367-1379.
- Cunha, R.B., Barbaro, K.C., Muramatsu, D., Portaro, F.C., Fontes, W., de Sousa, M.V., 2003. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. *J Protein Chem* 22, 135-146.
- Currie, B.J., 2004a. Snakebite in Australia: the role of the Venom Detection Kit. *Emerg Med Australas* 16, 384-386.
- Currie, B.J., 2004b. Snakebite in tropical Australia: a prospective study in the "Top End" of the Northern Territory. *Med J Aust* 181, 693-697.
- da Silva, P.H., da Silveira, R.B., Appel, M.H., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* 44, 693-709.
- da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2007a. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* 49, 758-768.
- da Silveira, R.B., Pigozzo, R.B., Chaim, O.M., Appel, M.H., Silva, D.T., Dreyfuss, J.L., Toma, L., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., Gremski, W., 2007b. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. *Biochimie* 89, 289-300.
- da Silveira, R.B., Wille, A.C., Chaim, O.M., Appel, M.H., Silva, D.T., Franco, C.R., Toma, L., Mangili, O.C., Gremski, W., Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S., 2007c. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem J* 406, 355-363.
- Das, R.N., Mukherjee, K., 2008. Asian wasp envenomation and acute renal failure: a report of two cases. *McGill J Med* 11, 25-28.
- Dawson, C.R., Drake, A.F., Helliwell, J., Hider, R.C., 1978. The interaction of bee melittin with lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 510, 75-86.

- de Andrade, S.A., Murakami, M.T., Cavalcante, D.P., Arni, R.K., Tambourgi, D.V., 2006. Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* 47, 380-386.
- de Graaf, D.C., Aerts, M., Danneels, E., Devreese, B., 2009. Bee, wasp and ant venomomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J Proteomics* 72, 145-154.
- De Maria, L., Vind, J., Oxenboll, K.M., Svendsen, A., Patkar, S., 2007. Phospholipases and their industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 290-300.
- de Oliveira Christoff, A., de Oliveira, A., Chaim, O.M., Lugarini, D., Bastos Pereira, A.L., Paludo, K.S., Queiroz Telles, J.E., Bracht, A., Veiga, S.S., Acco, A., 2008. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. *Toxicon* 52, 695-704.
- de Oliveira, J.S., Zaharenko, A.J., de Freitas, J.C., Konno, K., de Andrade, S.A., Portaro, F.C., Richardson, M., Sant'anna, O.A., Tambourgi, D.V., 2006. Caissarolysin I (Bcs I), a new hemolytic toxin from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*: purification and biological characterization. *Biochim Biophys Acta* 1760, 453-461.
- de Oliveira, M.R., Palma, M.S., 1998. Polybitoxins: a group of phospholipases A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). *Toxicon* 36, 189-199.
- de Oliveira, V.C., Lanari, L.C., Hajos, S.E., de Roodt, A.R., 2011. Toxicity of *Bothrops neuwiedi* complex ("yarara chica") venom from different regions of Argentina (Serpentes, Viperidae). *Toxicon* 57, 680-685.
- de Roodt, A.R., Coronas, F.I., Lago, N., Gonzalez, M.E., Laskowicz, R.D., Beltramino, J.C., Saavedra, S., Lopez, R.A., Reati, G.J., Vucharchuk, M.G., Bazan, E., Varni, L., Salomon, O.D., Possani, L.D., 2010. General biochemical and immunological characterization of the venom from the scorpion *Tityus trivittatus* of Argentina. *Toxicon* 55, 307-319.
- de Roodt, A.R., Lago, N.R., Salomon, O.D., Laskowicz, R.D., Neder de Roman, L.E., Lopez, R.A., Montero, T.E., Vega Vdel, V., 2009. A new venomous scorpion responsible for severe envenomation in Argentina: *Tityus confluens*. *Toxicon* 53, 1-8.
- De Roodt, A.R., Salomon, O.D., Lloveras, S.C., Orduna, T.A., 2002. [Poisoning by spiders of *Loxosceles* genus]. *Medicina (B Aires)* 62, 83-94.
- de Santi Ferrara, G.I., Fernandes-Pedrosa Mde, F., Junqueira-de-Azevedo Ide, L., Goncalves-de-Andrade, R.M., Portaro, F.C., Manzoni-de-Almeida, D., Murakami, M.T., Arni, R.K., van den Berg, C.W., Ho, P.L., Tambourgi, D.V., 2009. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon* 53, 743-753.
- de Souza, A.L., Malaque, C.M., Sztajnbock, J., Romano, C.C., Duarte, A.J., Seguro, A.C., 2008. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. *Toxicon* 51, 151-156.
- Dennis, E.A., 1997. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 22, 1-2.
- Diaz-Oreiro, C., Gutierrez, J.M., 1997. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* 35, 241-252.
- Diaz, C., Gutierrez, J.M., Lomonte, B., Gene, J.A., 1991. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A2, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochim Biophys Acta* 1070, 455-460.

- Diaz, C., Leon, G., Rucavado, A., Rojas, N., Schroit, A.J., Gutierrez, J.M., 2001. Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A(2): role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. *Arch Biochem Biophys* 391, 56-64.
- Doery, H.M., Pearson, J.E., 1961. Haemolysins in venoms of Australian snakes. Observations on the haemolysins of the venoms of some Australian snakes and the separation of phospholipase A from the venom of *Pseudechis porphyriacus*. *Biochem J* 78, 820-827.
- Doery, H.M., Pearson, J.E., 1964. Phospholipase B in snake venoms and bee venom. *Biochem J* 92, 599-602.
- dos Santos, J.I., Cintra-Francischinelli, M., Borges, R.J., Fernandes, C.A., Pizzo, P., Cintra, A.C., Braz, A.S., Soares, A.M., Fontes, M.R., 2011. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A class. *Proteins* 79, 61-78.
- dos Santos, J.I., Fernandes, C.A., Magro, A.J., Fontes, M.R., 2009. The intriguing phospholipases A2 homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. *Protein Pept Lett* 16, 887-893.
- dos Santos, J.I., Santos-Filho, N.A., Soares, A.M., Fontes, M.R., 2010a. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops pirajai* venom complexed with rosmarinic acid. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66, 699-701.
- dos Santos, L.D., Santos, K.S., Pinto, J.R., Dias, N.B., de Souza, B.M., dos Santos, M.F., Perales, J., Domont, G.B., Castro, F.M., Kalil, J.E., Palma, M.S., 2010b. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. *J Proteome Res* 9, 3867-3877.
- Drechsler, A., Anderluh, G., Norton, R.S., Separovic, F., 2010. Solid-state NMR study of membrane interactions of the pore-forming cytolysin, equinatoxin II. *Biochim Biophys Acta* 1798, 244-251.
- Eaton, J.T., Naylor, C.E., Howells, A.M., Moss, D.S., Titball, R.W., Basak, A.K., 2002. Crystal structure of the *C. perfringens* alpha-toxin with the active site closed by a flexible loop region. *J Mol Biol* 319, 275-281.
- Edwards, L.P., Whitter, E., Hessinger, D.A., 2002. Apparent membrane pore-formation by Portuguese Man-of-war (*Physalia physalis*) venom in intact cultured cells. *Toxicon* 40, 1299-1305.
- Edwards, M.J., Dimmock, N.J., 2001. Hemagglutinin 1-specific immunoglobulin G and Fab molecules mediate postattachment neutralization of influenza A virus by inhibition of an early fusion event. *J Virol* 75, 10208-10218.
- Feil, S.C., Polekhina, G., Gorman, M.A., Parker, M.W., 2010. Proteins: membrane binding and pore formation. Introduction. *Adv Exp Med Biol* 677, 1-13.
- Fernandes, C.A., Marchi-Salvador, D.P., Salvador, G.M., Silva, M.C., Costa, T.R., Soares, A.M., Fontes, M.R., 2010. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca(2+)-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA(2)s. *J Struct Biol*.
- Fischer, M.L., Cokl, A., Ramires, E.N., Marques-da-Silva, E., Delay, C., Fontana, J.D., Donatti, L., Schneider, V.F., Marques Fde, A., 2009. Sound is involved in multimodal communication of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitao, 1934 (Araneae; Sicariidae). *Behav Processes* 82, 236-243.
- Fischer, W.B., Hsu, H.J., 2011. Viral channel forming proteins - modeling the target. *Biochim Biophys Acta* 1808, 561-571.

- Foller, M., Bobbala, D., Koka, S., Boini, K.M., Mahmud, H., Kasinathan, R.S., Shumilina, E., Amann, K., Beranek, G., Sausbier, U., Ruth, P., Sausbier, M., Lang, F., Huber, S.M., 2010. Functional significance of the intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel for the short-term survival of injured erythrocytes. *Pflugers Arch* 460, 1029-1044.
- Fox, J.W., Ma, L., Nelson, K., Sherman, N.E., Serrano, S.M., 2006. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. *Toxicon* 47, 700-714.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2008. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics* 8, 909-920.
- França, F.O., Benvenuti, L.A., Fan, H.W., Dos Santos, D.R., Hain, S.H., Picchi-Martins, F.R., Cardoso, J.L., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D., Warrell, D.A., 1994. Severe and fatal mass attacks by 'killer' bees (Africanized honey bees--*Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. *Q J Med* 87, 269-282.
- Fujimoto, Y., Kaku, T., 1982. Isolation and some properties of the hemolysins from the crude venom extract of scorpion telson, *Heterometrus gravimanus*. *J Pharmacobiodyn* 5, 63-72.
- Futrell, J.M., 1992. Loxoscelism. *Am J Med Sci* 304, 261-267.
- Gamborgi, G.P., Metcalf, E.B., Barros, E.J., 2006. Acute renal failure provoked by toxin from caterpillars of the species *Lonomia obliqua*. *Toxicon* 47, 68-74.
- Garcia Denegri, M.E., Acosta, O.C., Huancahuire-Vega, S., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., Marunak, S.L., Teibler, G.P., Leiva, L.C., Ponce-Soto, L.A., 2010. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon* 56, 64-74.
- Garcia, T., Martinez, D., Palmero, A., Soto, C., Tejuca, M., Pazos, F., Menendez, R., Alvarez, C., Garateix, A., 2009. Pharmacological effects of two cytolytins isolated from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *J Biosci* 34, 891-898.
- Garnier, P., Goudey-Perriere, F., Breton, P., Dewulf, C., Petek, F., Perriere, C., 1995. Enzymatic properties of the stonefish (*Synanceia verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. *Toxicon* 33, 143-155.
- Geny, B., Popoff, M.R., 2006. Bacterial protein toxins and lipids: role in toxin targeting and activity. *Biol Cell* 98, 633-651.
- Ghadessy, F.J., Chen, D., Kini, R.M., Chung, M.C., Jeyaseelan, K., Khoo, H.E., Yuen, R., 1996. Stonustoxin is a novel lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. cDNA cloning and characterization. *J Biol Chem* 271, 25575-25581.
- Gilbert, R.J., 2002. Pore-forming toxins. *Cell Mol Life Sci* 59, 832-844.
- Gillissen, A., Theakston, R.D., Barth, J., May, B., Krieg, M., Warrell, D.A., 1994. Neurotoxicity, haemostatic disturbances and haemolytic anaemia after a bite by a Tunisian saw-scaled or carpet viper (*Echis 'pyramidum'*-complex): failure of antivenom treatment. *Toxicon* 32, 937-944.
- Gold, B.S., Barish, R.A., Dart, R.C., 2004. North American snake envenomation: diagnosis, treatment, and management. *Emerg Med Clin North Am* 22, 423-443, ix.
- Goldfrank, L.R., 1992. Medical toxicology. *JAMA* 268, 375-376.
- Goldfrank, L.R., 1999. David R. Boyd lecture in trauma care and emergency medical systems: "The surgical complications of toxins.". *J Emerg Med* 17, 1055-1064.
- Goldfrank, L.R., 2009. Call centers, disaster medicine, and public health preparedness. *Disaster Med Public Health Prep* 3, 136-137.

- Gonzalez-Zorn, B., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Ripio, M.T., Vega, Y., Novella, S., Vazquez-Boland, J.A., 1999. The smcL gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol Microbiol* 33, 510-523.
- Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Chaim, O.M., Probst, C.M., Ferrer, V.P., Nowatzki, J., Weinschutz, H.C., Madeira, H.M., Gremski, W., Nader, H.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2010. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol Biosyst* 6, 2403-2416.
- Grotendorst, G.R., Hessinger, D.A., 2000. Enzymatic characterization of the major phospholipase A2 component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* 38, 931-943.
- Gutierrez-Aguirre, I., Barlic, A., Podlesek, Z., Macek, P., Anderluh, G., Gonzalez-Manas, J.M., 2004. Membrane insertion of the N-terminal alpha-helix of equinatoxin II, a sea anemone cytolytic toxin. *Biochem J* 384, 421-428.
- Gutierrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., 2009a. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54, 976-987.
- Gutierrez, J.M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405-1424.
- Gutierrez, J.M., Lomonte, B., Leon, G., Alape-Giron, A., Flores-Diaz, M., Sanz, L., Angulo, Y., Calvete, J.J., 2009b. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J Proteomics* 72, 165-182.
- Gutierrez, J.M., Rucavado, A., Chaves, F., Diaz, C., Escalante, T., 2009c. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54, 958-975.
- Haddad, P.J., 2006. Aeroplanes rarely crash nowadays, therefore they don't need pilots: anaesthesia, anaesthetists and cataract surgery. *Clin Experiment Ophthalmol* 34, 503-504; author reply 504.
- Haddad, V., 2nd, de Paula Neto, J.B., Cobo, V.J., 2006. Venomous mollusks: the risks of human accidents by conus snails (gastropoda: conidae) in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 39, 498-500.
- Haddad, V., Jr., Cardoso, J.L., Silveira, F.L., 2001. Seabather's eruption: report of five cases in southeast region of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43, 171-172.
- Haddad, V., Jr., Coltro, M., Simone, L.R., 2009. Report of a human accident caused by *Conus regius* (Gastropoda, Conidae). *Rev Soc Bras Med Trop* 42, 446-448.
- Haddad, V., Jr., da Silveira, F.L., Cardoso, J.L., Morandini, A.C., 2002. A report of 49 cases of cnidarian envenoming from southeastern Brazilian coastal waters. *Toxicon* 40, 1445-1450.
- Haddad, V., Jr., Martins, I.A., Makyama, H.M., 2003. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon* 42, 79-83.
- Haeggstrom, J.Z., Rinaldo-Matthis, A., Wheelock, C.E., Wetterholm, A., 2010. Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 135-139.
- Harsch, A., Konno, K., Takayama, H., Kawai, N., Robinson, H., 1998. Effects of alpha-pompilidotoxin on synchronized firing in networks of rat cortical neurons. *Neurosci Lett* 252, 49-52.
- Harvey, J., Wedley, S., Findlay, J.D., Sidell, M.R., Pullar, I.A., 1996. omega-Agatoxin IVA identifies a single calcium channel subtype which contributes to the potassium-

- induced release of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine, dopamine, gamma-aminobutyric acid and glutamate from rat brain slices. *Neuropharmacology* 35, 385-392.
- Hawgood, B.J., 1992. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950). *Toxicon* 30, 573-579.
- Hayashida, A., Bartlett, A.H., Foster, T.J., Park, P.W., 2009. Staphylococcus aureus beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *Am J Pathol* 174, 509-518.
- Helmholz, H., 2010. Selective toxin-lipid membrane interactions of natural, haemolytic Scyphozoan toxins analyzed by surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* 1798, 1944-1952.
- Helmholz, H., Ruhnau, C., Schutt, C., Prange, A., 2007. Comparative study on the cell toxicity and enzymatic activity of two northern scyphozoan species *Cyanea capillata* (L.) and *Cyanea lamarckii* (Peron & Leslieur). *Toxicon* 50, 53-64.
- Hisada, M., Konno, K., Itagaki, Y., Naoki, H., Nakajima, T., 2002. Sequencing wasp venom peptides by endopeptidase digestion and nested collision-induced dissociation/post-source decay methods. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16, 1040-1048.
- Ho, C.L., Ko, J.L., 1988. Purification and characterization of a lethal protein with phospholipase A1 activity from the hornet (*Vespa basalis*) venom. *Biochim Biophys Acta* 963, 414-422.
- Ho, C.L., Ko, J.L., Lee, C.Y., 1986. Differences in pharmacological actions between beta-bungarotoxin and other neurotoxic phospholipases A2 purified from snake venoms. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 10, 196-202.
- Ho, C.L., Lin, Y.L., Li, S.F., 1999. Three toxins with phospholipase activity isolated from the yellow-legged hornet (*Vespa verutina*) venom. *Toxicon* 37, 1015-1024.
- Hoffman, D.R., 1985. Allergens in Hymenoptera venom XIII: Isolation and purification of protein components from three species of vespid venoms. *J Allergy Clin Immunol* 75, 599-605.
- Hogan, C.J., Barbaro, K.C., Winkel, K., 2004. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann Emerg Med* 44, 608-624.
- Holland, D.R., Clancy, L.L., Muchmore, S.W., Ryde, T.J., Einspahr, H.M., Finzel, B.C., Heinrikson, R.L., Watenpaugh, K.D., 1990. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A2 from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-A resolution. *J Biol Chem* 265, 17649-17656.
- Hunt, S., Green, J., Artymiuk, P.J., 2010. Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA) and related toxins. *Adv Exp Med Biol* 677, 116-126.
- Huseby, M., Shi, K., Brown, C.K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K.S., Bohach, G.A., Schlievert, P.M., Ohlendorf, D.H., Earhart, C.A., 2007. Structure and biological activities of beta toxin from Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* 189, 8719-8726.
- Ibarra-Alvarado, C., Alejandro Garcia, J., Aguilar, M.B., Rojas, A., Falcon, A., Heimer de la Cotera, E.P., 2007. Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146, 511-518.
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D.C., Scemes, E., 2009. Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels". *J Neurosci* 29, 7092-7097.
- Ikezawa, H., Mori, M., Taguchi, R., 1980. Studies on sphingomyelinase of *Bacillus cereus*: hydrolytic and hemolytic actions on erythrocyte membranes. *Arch Biochem Biophys* 199, 572-578.
- Isbister, G.K., Hooper, M.R., Dowsett, R., Maw, G., Murray, L., White, J., 2006. Collett's snake (*Pseudechis colletti*) envenoming in snake handlers. *QJM* 99, 109-115.

- Jackson, M.R., Olson, D.W., Beckett, W.C., Jr., Olsen, S.B., Robertson, F.M., 1992. Abdominal vascular trauma: a review of 106 injuries. *Am Surg* 58, 622-626.
- Jalali, A., Pipelzadeh, M.H., Sayedian, R., Rowan, E.G., 2010. A review of epidemiological, clinical and in vitro physiological studies of envenomation by the scorpion *Hemiscorpius lepturus* (Hemiscorpiidae) in Iran. *Toxicon* 55, 173-179.
- Jiang, Y., Li, Y., Lee, W., Xu, X., Zhang, Y., Zhao, R., Wang, W., 2011. Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. *BMC Genomics* 12, 1.
- Kanjanabuch, T., Sitprija, V., 2008. Snakebite nephrotoxicity in Asia. *Semin Nephrol* 28, 363-372.
- Karlsson, E., Risinger, C., Jolkkonen, M., Wernstedt, C., Adem, A., 1991a. Amino acid sequence of a snake venom toxin that binds to the muscarinic acetylcholine receptor. *Toxicon* 29, 521-526.
- Karlsson, J.O., Andersson, R.G., Askelof, P., Elwing, H., Granstrom, M., Grundstrom, N., Lundstrom, I., Ohman, L., 1991b. The melanophore aggregating response of isolated fish scales: a very rapid and sensitive diagnosis of whooping cough. *FEMS Microbiol Lett* 66, 169-175.
- Kastin, A.J., Pan, W., 2006. Intranasal leptin: blood-brain barrier bypass (BBBB) for obesity? *Endocrinology* 147, 2086-2087.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D.G., de Silva, H.J., 2008. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med* 5, e218.
- Ketelhut, D.F., de Mello, M.H., Veronese, E.L., Esmeraldino, L.E., Murakami, M.T., Arni, R.K., Giglio, J.R., Cintra, A.C., Sampaio, S.V., 2003. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie* 85, 983-991.
- Khoo, H.E., 2002. Bioactive proteins from stonefish venom. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 802-806.
- Killian, J.A., von Heijne, G., 2000. How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem Sci* 25, 429-434.
- King, T.P., Kochoumian, L., Joslyn, A., 1984. Wasp venom proteins: phospholipase A1 and B. *Arch Biochem Biophys* 230, 1-12.
- Kini, R.M., 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem J* 397, 377-387.
- Kinoshita, E., Maejima, H., Yamaoka, K., Konno, K., Kawai, N., Shimizu, E., Yokote, S., Nakayama, H., Seyama, I., 2001. Novel wasp toxin discriminates between neuronal and cardiac sodium channels. *Mol Pharmacol* 59, 1457-1463.
- Konno, K., Hisada, M., Fontana, R., Lorenzi, C.C., Naoki, H., Itagaki, Y., Miwa, A., Kawai, N., Nakata, Y., Yasuhara, T., Ruggiero Neto, J., de Azevedo, W.F., Jr., Palma, M.S., Nakajima, T., 2001. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim Biophys Acta* 1550, 70-80.
- Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Kawai, N., Miwa, A., Yasuhara, T., Morimoto, Y., Nakata, Y., 2000. Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). *Toxicon* 38, 1505-1515.
- Kowacs, P.A., Cardoso, J., Entres, M., Novak, E.M., Werneck, L.C., 2006. Fatal intracerebral hemorrhage secondary to *Lonomia obliqua* caterpillar envenoming: case report. *Arq Neuropsiquiatr* 64, 1030-1032.

- Kristan, K., Podlessek, Z., Hojnik, V., Gutierrez-Aguirre, I., Guncar, G., Turk, D., Gonzalez-Manas, J.M., Lakey, J.H., Macek, P., Anderluh, G., 2004. Pore formation by equinatoxin, a eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable beta-sandwich. *J Biol Chem* 279, 46509-46517.
- Kristan, K., Viero, G., Macek, P., Dalla Serra, M., Anderluh, G., 2007. The equinatoxin N-terminus is transferred across planar lipid membranes and helps to stabilize the transmembrane pore. *FEBS J* 274, 539-550.
- Kristan, K.C., Viero, G., Dalla Serra, M., Macek, P., Anderluh, G., 2009. Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon* 54, 1125-1134.
- Kusma, J., Chaim, O.M., Wille, A.C., Ferrer, V.P., Sade, Y.B., Donatti, L., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S., 2008. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie* 90, 1722-1736.
- Labrie, V., Harel, J., Dubreuil, J.D., 2001. Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic alpha-helix. *Biochim Biophys Acta* 1535, 128-133.
- Lanari, L.C., Rosset, S., Gonzalez, M.E., Liria, N., de Roodt, A.R., 2010. A study on the venom of *Bothrops alternatus* Dumeril, Bibron and Dumeril, from different regions of Argentina. *Toxicon* 55, 1415-1424.
- Lee, S., Lynch, K.R., 2005. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem J* 391, 317-323.
- Lee, W.H., da Silva Giotto, M.T., Marangoni, S., Toyama, M.H., Polikarpov, I., Garratt, R.C., 2001. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2--a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. *Biochemistry* 40, 28-36.
- Lemmon, M.A., 2008. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 99-111.
- Lizano, S., Angulo, Y., Lomonte, B., Fox, J.W., Lambeau, G., Lazdunski, M., Gutierrez, J.M., 2000. Two phospholipase A2 inhibitors from the plasma of *Cerrophidion* (*Bothrops*) *godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. *Biochem J* 346 Pt 3, 631-639.
- Llewellyn, L.E., Norton, R.S., 1991. Binding of the sea anemone polypeptide BDS II to the voltage-gated sodium channel. *Biochem Int* 24, 937-946.
- Lopes-Ferreira, M., Moura-da-Silva, A.M., Mota, I., Takehara, H.A., 2000. Neutralization of *Thalassophryne nattereri* (niquim) fish venom by an experimental antivenom. *Toxicon* 38, 1149-1156.
- Lourenco, W.R., Ythier, E., Cloudsley-Thompson, J.L., 2008. Observations on the life history of *Chaerilus philippinus* Lourenco & Ythier, 2008 (Scorpiones, Chaerilidae) from the Philippines. *C R Biol* 331, 896-900.
- Lucas, S., 1988. Spiders in Brazil. *Toxicon* 26, 759-772.
- Macias, I., Salas de Zayas, R., Zoila, L., Dolera, C., 2009. [Intravascular hemolysis due to *Clostridium perfringens* in an immunocompetent patient]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27, 548-549.
- Magro, A.J., Fernandes, C.A., dos Santos, J.I., Fontes, M.R., 2009. Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A2s from snake venoms. *Protein Pept Lett* 16, 852-859.

- Malague, C.M., Andrade, L., Madalosso, G., Tomy, S., Tavares, F.L., Seguro, A.C., 2006. Short report: A case of hemolysis resulting from contact with a *Lonomia* caterpillar in southern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 74, 807-809.
- Maloy, W.L., Kari, U.P., 1995. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* 37, 105-122.
- Malpezzi, E.L., Freitas, J.C., 1991. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Braz J Med Biol Res* 24, 1245-1249.
- Mancheno, J.M., De Los Rios, V., Martinez Del Pozo, A., Lanio, M.E., Onaderra, M., Gavilanes, J.G., 2001. Partially folded states of the cytolytic protein sticholysin II. *Biochim Biophys Acta* 1545, 122-131.
- Mancheno, J.M., Martin-Benito, J., Martinez-Ripoll, M., Gavilanes, J.G., Hermoso, J.A., 2003. Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure* 11, 1319-1328.
- Maraganore, J.M., Henrikson, R.L., 1986. The lysine-49 phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A2. *J Biol Chem* 261, 4797-4804.
- Maraganore, J.M., Merutka, G., Cho, W., Welches, W., Kezdy, F.J., Henrikson, R.L., 1984. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J Biol Chem* 259, 13839-13843.
- Marino, A., Morabito, R., La Spada, G., 2009. Factors altering the haemolytic power of crude venom from *Aiptasia mutabilis* (Anthozoa) nematocysts. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 152, 418-422.
- Marques-da-Silva, E., Fischer, M.L., 2005. [*Loxosceles Heinecken* & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Parana]. *Rev Soc Bras Med Trop* 38, 331-335.
- Martins, R.D., Alves, R.S., Martins, A.M., Barbosa, P.S., Evangelista, J.S., Evangelista, J.J., Ximenes, R.M., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Souza, A.J., Orts, D.J., Marangoni, S., de Menezes, D.B., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S., 2009. Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A(2) from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon* 54, 413-420.
- McDade, J., Aygun, B., Ware, R.E., 2010. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation leading to acute hemolytic anemia in six adolescents. *J Pediatr* 156, 155-157.
- Meinardi, E., Florin-Christensen, M., Paratcha, G., Azcurra, J.M., Florin-Christensen, J., 1995. The molecular basis of the self/nonself selectivity of a coelenterate toxin. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 348-354.
- Monastyrnaya, M., Leychenko, E., Isaeva, M., Likhatskaya, G., Zelepuga, E., Kostina, E., Trifonov, E., Nurminski, E., Kozlovskaya, E., 2010. Actinoporins from the sea anemones, tropical *Radianthus macrodactylus* and northern *Oulactis orientalis*: Comparative analysis of structure-function relationships. *Toxicon* 56, 1299-1314.
- Montecucco, C., Gutierrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci* 65, 2897-2912.
- Moreau, H., Pieroni, G., Jolivet-Reynaud, C., Alouf, J.E., Verger, R., 1988. A new kinetic approach for studying phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) activity on phospholipid monolayers. *Biochemistry* 27, 2319-2323.
- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., de Andrade, S.A., Gabdoulkhakov, A., Betzel, C., Tambourgi, D.V., Arni, R.K., 2006. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to

- glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 323-329.
- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., Tambourgi, D.V., Arni, R.K., 2005. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J Biol Chem* 280, 13658-13664.
- Murray, L.M., O'Brien, P., Taylor, R.J., 2003. Stereoselective reactions of a (-)-quinic acid-derived enone: application to the synthesis of the core of scyphostatin. *Org Lett* 5, 1943-1946.
- Nagahama, M., Mukai, M., Ochi, S., Sakurai, J., 2000. Role of tryptophan-1 in hemolytic and phospholipase C activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Microbiol Immunol* 44, 585-589.
- Nagahama, M., Nakayama, T., Michiue, K., Sakurai, J., 1997. Site-specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130, or Glu-152 causes loss of enzymatic and hemolytic activities. *Infect Immun* 65, 3489-3492.
- Nagahama, M., Ochi, S., Kobayashi, K., Sakurai, J., 1996. The relationship between histidine residues and various biological activities of *Clostridium perfringens* alpha toxin. *Adv Exp Med Biol* 391, 251-255.
- Nagahama, M., Okagawa, Y., Nakayama, T., Nishioka, E., Sakurai, J., 1995. Site-directed mutagenesis of histidine residues in *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J Bacteriol* 177, 1179-1185.
- Navarro-Silva, M.A., Duque, J.E., Ramires, E.N., Andrade, C.F., Marques-da-Silva, E., Marques, F.A., Delay, C.E., Fontana, J.D., Silva, A.C., Fraguas, G.M., 2010. Chemical control of *Loxosceles intermedia* (Araneae: Sicariidae) with pyrethroids: field and laboratory evaluation. *J Econ Entomol* 103, 166-171.
- Nevalainen, T.J., Peuravuori, H.J., Quinn, R.J., Llewellyn, L.E., Benzie, J.A., Fenner, P.J., Winkel, K.D., 2004. Phospholipase A2 in cnidaria. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139, 731-735.
- Nonato, M.C., Garratt, R.C., Mascarenhas, Y.P., Jesus, W.D., Assakura, M.T., Serrano, S.M., Oliva, G., 2001. Crystallization and preliminary crystallographic studies of a phospholipase A2 from the venom of the Brazilian snake *Bothrops moojeni*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 599-601.
- Norton, R.S., 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* 29, 1051-1084.
- Nuchprayoon, I., Sai-Ngam, A., Suntrarachun, S., Noiphrom, J., Pakmanee, N., Chanhom, L., Nuchprayoon, S., Sitprija, V., 2001. Molecular cloning of phospholipase A2 from a Thai Russell's viper venom gland cDNA library. *J Med Assoc Thai* 84 Suppl 1, S99-105.
- Ochi, S., Hashimoto, K., Nagahama, M., Sakurai, J., 1996. Phospholipid metabolism induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin elicits a hot-cold type of hemolysis in rabbit erythrocytes. *Infect Immun* 64, 3930-3933.
- Ochi, S., Miyawaki, T., Matsuda, H., Oda, M., Nagahama, M., Sakurai, J., 2002. *Clostridium perfringens* alpha-toxin induces rabbit neutrophil adhesion. *Microbiology* 148, 237-245.
- Ochi, S., Oda, M., Matsuda, H., Ikari, S., Sakurai, J., 2004. *Clostridium perfringens* alpha-toxin activates the sphingomyelin metabolism system in sheep erythrocytes. *J Biol Chem* 279, 12181-12189.
- Ochi, S., Oda, M., Nagahama, M., Sakurai, J., 2003. *Clostridium perfringens* alpha-toxin-induced hemolysis of horse erythrocytes is dependent on Ca²⁺ uptake. *Biochim Biophys Acta* 1613, 79-86.

- Oda, M., Kihara, A., Yoshioka, H., Saito, Y., Watanabe, N., Uoo, K., Higashihara, M., Nagahama, M., Koide, N., Yokochi, T., Sakurai, J., 2008a. Effect of erythromycin on biological activities induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J Pharmacol Exp Ther* 327, 934-940.
- Oda, M., Matsuno, T., Shiihara, R., Ochi, S., Yamauchi, R., Saito, Y., Imagawa, H., Nagahama, M., Nishizawa, M., Sakurai, J., 2008b. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J Lipid Res* 49, 1039-1047.
- Oda, M., Takahashi, M., Matsuno, T., Uoo, K., Nagahama, M., Sakurai, J., 2010. Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta* 1798, 1073-1080.
- Owen, M.D., Pfaff, L.A., Reisman, R.E., Wypych, J., 1990. Phospholipase A2 in venom extracts from honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Toxicon* 28, 813-820.
- Panchal, R.G., Smart, M.L., Bowser, D.N., Williams, D.A., Petrou, S., 2002. Pore-forming proteins and their application in biotechnology. *Curr Pharm Biotechnol* 3, 99-115.
- Parker, M.W., Feil, S.C., 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 88, 91-142.
- Paudel, B., Paudel, K., 2009. A study of wasp bites in a tertiary hospital of western Nepal. *Nepal Med Coll J* 11, 52-56.
- Pauli, I., Puka, J., Gubert, I.C., Minozzo, J.C., 2006. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon* 48, 123-137.
- Pernet, C., Dandurand, M., Meunier, L., Stoeber, P.E., 2010. [Necrotic arachnidism in the south of France: two clinical cases of loxoscelism]. *Ann Dermatol Venereol* 137, 808-812.
- Pinto, A.F., Berger, M., Reck, J., Jr., Terra, R.M., Guimaraes, J.A., 2010. *Lonomia obliqua* venom: In vivo effects and molecular aspects associated with the hemorrhagic syndrome. *Toxicon* 56, 1103-1112.
- Pipelzadeh, M.H., Dezfulian, A.R., Jalali, M.T., Mansouri, A.K., 2006. In vitro and in vivo studies on some toxic effects of the venom from *Hemiscorpius lepturus* scorpion. *Toxicon* 48, 93-103.
- Pomerantsev, A.P., Kalnin, K.V., Osorio, M., Leppla, S.H., 2003. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infect Immun* 71, 6591-6606.
- Pramanik, S., Banerjee, S., 2007. Wasp stings with multisystem dysfunction. *Indian Pediatr* 44, 788-790.
- Projan, S.J., Archer, G.L., 1989. Mobilization of the relaxable *Staphylococcus aureus* plasmid pC221 by the conjugative plasmid pGO1 involves three pC221 loci. *J Bacteriol* 171, 1841-1845.
- Queiroz, G.P., Pessoa, L.A., Portaro, F.C., Furtado Mde, F., Tambourgi, D.V., 2008. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon* 52, 842-851.
- Quiros, S., Gene, J.A., Gutierrez, J.M., Thelestam, M., 1992. Effect of *Bothrops asper* (Fer-De-Lance) snake venom on erythrocyte membrane. A comparative study. *Comp Biochem Physiol C* 101, 433-436.
- Reisman, R.E., Osur, S.L., 1987. Allergic reactions following first insect sting exposure. *Ann Allergy* 59, 429-432.
- Ribeiro, R.O., Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Gremski, L.H., Sade, Y.B., Paludo, K.S., Senff-Ribeiro, A., de Moura, J., Chavez-Olortegui, C., Gremski, W., Nader, H.B.,

- Veiga, S.S., 2007. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 50, 1162-1174.
- Rodrigues, R.S., Izidoro, L.F., Teixeira, S.S., Silveira, L.B., Hamaguchi, A., Homs-Brandeburgo, M.I., Selistre-de-Araujo, H.S., Giglio, J.R., Fuly, A.L., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., 2007. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* 50, 153-165.
- Rodriguez, I., Kaszkin, M., Holloschi, A., Kabsch, K., Marques, M.M., Mao, X., Alonso, A., 2002. Hyperosmotic stress induces phosphorylation of cytosolic phospholipase A(2) in HaCaT cells by an epidermal growth factor receptor-mediated process. *Cell Signal* 14, 839-848.
- Rogers, J., Yu, B.Z., Serves, S.V., Tsivgoulis, G.M., Sotiropoulos, D.N., Ioannou, P.V., Jain, M.K., 1996. Kinetic basis for the substrate specificity during hydrolysis of phospholipids by secreted phospholipase A2. *Biochemistry* 35, 9375-9384.
- Rottini, G., Gusmani, L., Parovel, E., Avian, M., Patriarca, P., 1995. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon* 33, 315-326.
- Sahara, Y., Gotoh, M., Konno, K., Miwa, A., Tsubokawa, H., Robinson, H.P., Kawai, N., 2000. A new class of neurotoxin from wasp venom slows inactivation of sodium current. *Eur J Neurosci* 12, 1961-1970.
- Salazar, A.M., Aguilar, I., Guerrero, B., Giron, M.E., Lucena, S., Sanchez, E.E., Rodriguez-Acosta, A., 2008. Intraspecies differences in hemostatic venom activities of the South American rattlesnakes, *Crotalus durissus cumanensis*, as revealed by a range of protease inhibitors. *Blood Coagul Fibrinolysis* 19, 525-530.
- Saldarriaga, M.M., Otero, R., Nunez, V., Toro, M.F., Diaz, A., Gutierrez, J.M., 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42, 405-411.
- Sams, H.H., Hearsh, S.B., Long, L.L., Wilson, D.C., Sanders, D.H., King, L.E., Jr., 2001. Nineteen documented cases of *Loxosceles reclusa* envenomation. *J Am Acad Dermatol* 44, 603-608.
- Sandes, R.L., Jr., Oliveira, C.L., Ferreira, E.S., Cruiff, E., Tavares, C., Santos, A.C., Franke, C.R., Bavia, M.E., 2009. Spatial analysis of migrating *Apis mellifera* colonies in Salvador, Bahia, Brazil. *Geospat Health* 4, 129-134.
- Santos, L.D., Santos, K.S., de Souza, B.M., Arcuri, H.A., Cunha-Neto, E., Castro, F.M., Kalil, J.E., Palma, M.S., 2007. Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). *Toxicon* 50, 923-937.
- Saravanan, R., Bhunia, A., Bhattacharjya, S., 2010. Micelle-bound structures and dynamics of the hinge deleted analog of melittin and its diastereomer: implications in cell selective lysis by D-amino acid containing antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1798, 128-139.
- Sauter, D., Goldfrank, L., 1987. Hematologic aspects of toxicology. *Hematol Oncol Clin North Am* 1, 335-349.
- Schon, P., Garcia-Saez, A.J., Malovrh, P., Bacia, K., Anderluh, G., Schwille, P., 2008. Equinatoxin II permeabilizing activity depends on the presence of sphingomyelin and lipid phase coexistence. *Biophys J* 95, 691-698.
- Schwartz, E.F., Camargos, T.S., Zamudio, F.Z., Silva, L.P., Bloch, C., Jr., Caixeta, F., Schwartz, C.A., Possani, L.D., 2008. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 51, 1499-1508.

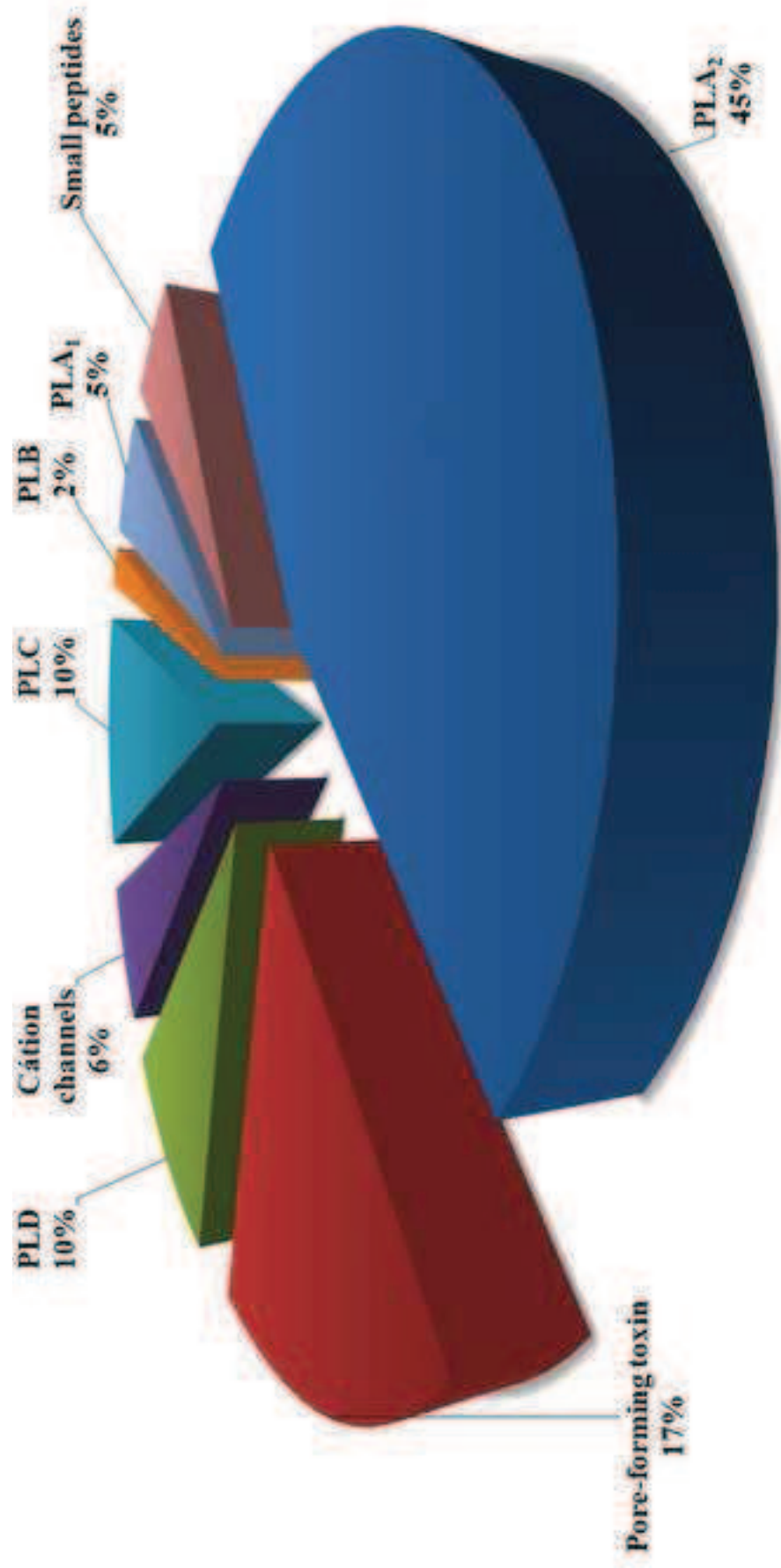
- 1 Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B., 1990.
2 Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science* 250, 1541-1546.
- 3 Segers, R.P., van der Drift, A., de Nijs, A., Corcione, P., van der Zeijst, B.A., Gaastra,
4 W., 1990. Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira*
5 *interrogans* serovar hardjo. *Infect Immun* 58, 2177-2185.
- 6 Seibert, C.S., Oliveira, M.R., Goncalves, L.R., Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S., 2004.
7 Intravascular hemolysis induced by *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract: an
8 experimental model of envenomation in rats. *Toxicon* 44, 793-799.
- 9 Seibert, C.S., Santoro, M.L., Tambourgi, D.V., Sampaio, S.C., Takahashi, H.K., Peres,
10 C.M., Curi, R., Sano-Martins, I.S., 2010. *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae)
11 caterpillar bristle extract induces direct lysis by cleaving erythrocyte membrane
12 glycoproteins. *Toxicon* 55, 1323-1330.
- 13 Seibert, C.S., Shinohara, E.M., Sano-Martins, I.S., 2003. In vitro hemolytic activity of
14 *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract on human and Wistar rat erythrocytes.
15 *Toxicon* 41, 831-839.
- 16 Seibert, C.S., Tanaka-Azevedo, A.M., Santoro, M.L., Mackessy, S.P., Soares Torquato,
17 R.J., Lebrun, I., Tanaka, A.S., Sano-Martins, I.S., 2006. Purification of a phospholipase
18 A2 from *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract. *Biochem Biophys Res Commun*
19 342, 1027-1033.
- 20 Senff-Ribeiro, A., Henrique da Silva, P., Chaim, O.M., Gremski, L.H., Paludo, K.S.,
21 Bertoni da Silveira, R., Gremski, W., Mangili, O.C., Veiga, S.S., 2008.
22 Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins.
23 *Biotechnol Adv* 26, 210-218.
- 24 Sepcic, K., Berne, S., Potrich, C., Turk, T., Macek, P., Menestrina, G., 2003. Interaction
25 of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with
26 lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *Eur J Biochem* 270, 1199-1210.
- 27 Shen, L.R., Ding, M.H., Zhang, L.W., Zhang, W.G., Liu, L., Li, D., 2010. Expression of
28 a bee venom phospholipase A2 from *Apis cerana cerana* in the baculovirus-insect cell. *J*
29 *Zhejiang Univ Sci B* 11, 342-349.
- 30 Shen, Y., Zheng, Y., Foster, D.A., 2002. Phospholipase D2 stimulates cell protrusion in
31 v-Src-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 201-206.
- 32 Shiloah, J., Klibansky, C., de Vries, A., Berger, A., 1973. Phospholipase B activity of a
33 purified phospholipase A from *Vipera palestinae* venom. *J Lipid Res* 14, 267-278.
- 34 Shimabuku, P.S., Fernandes, C.A., Magro, A.J., Costa, T.R., Soares, A.M., Fontes,
35 M.R., 2011. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a Lys49-
36 phospholipase A2 complexed with caffeic acid, a molecule with inhibitory properties
37 against snake venoms. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 67, 249-252.
- 38 Shiomi, K., 2009. Novel peptide toxins recently isolated from sea anemones. *Toxicon*
39 54, 1112-1118.
- 40 Shiomi, K., Arita, J., Nagashima, Y., Shinagawa, A., 1995. Detection of a proteinaceous
41 toxin in the brackishwater clam (*Corbicula japonica*). *Toxicon* 33, 699-702.
- 42 Shiomi, K., Igarashi, T., Yokota, H., Nagashima, Y., Ishida, M., 2000. Isolation and
43 structures of grammistins, peptide toxins from the skin secretion of the soapfish
44 *Grammistes sexlineatus*. *Toxicon* 38, 91-103.
- 45 Shiomi, K., Kawashima, Y., Mizukami, M., Nagashima, Y., 2002. Properties of
46 proteinaceous toxins in the salivary gland of the marine gastropod (*Monoplex echo*).
47 *Toxicon* 40, 563-571.
- 48 Shiomi, K., Takamiya, M., Yamanaka, H., Kikuchi, T., Konno, K., 1986. Hemolytic,
49 lethal and edema-forming activities of the skin secretion from the oriental catfish
50 (*Plotosus lineatus*). *Toxicon* 24, 1015-1018.

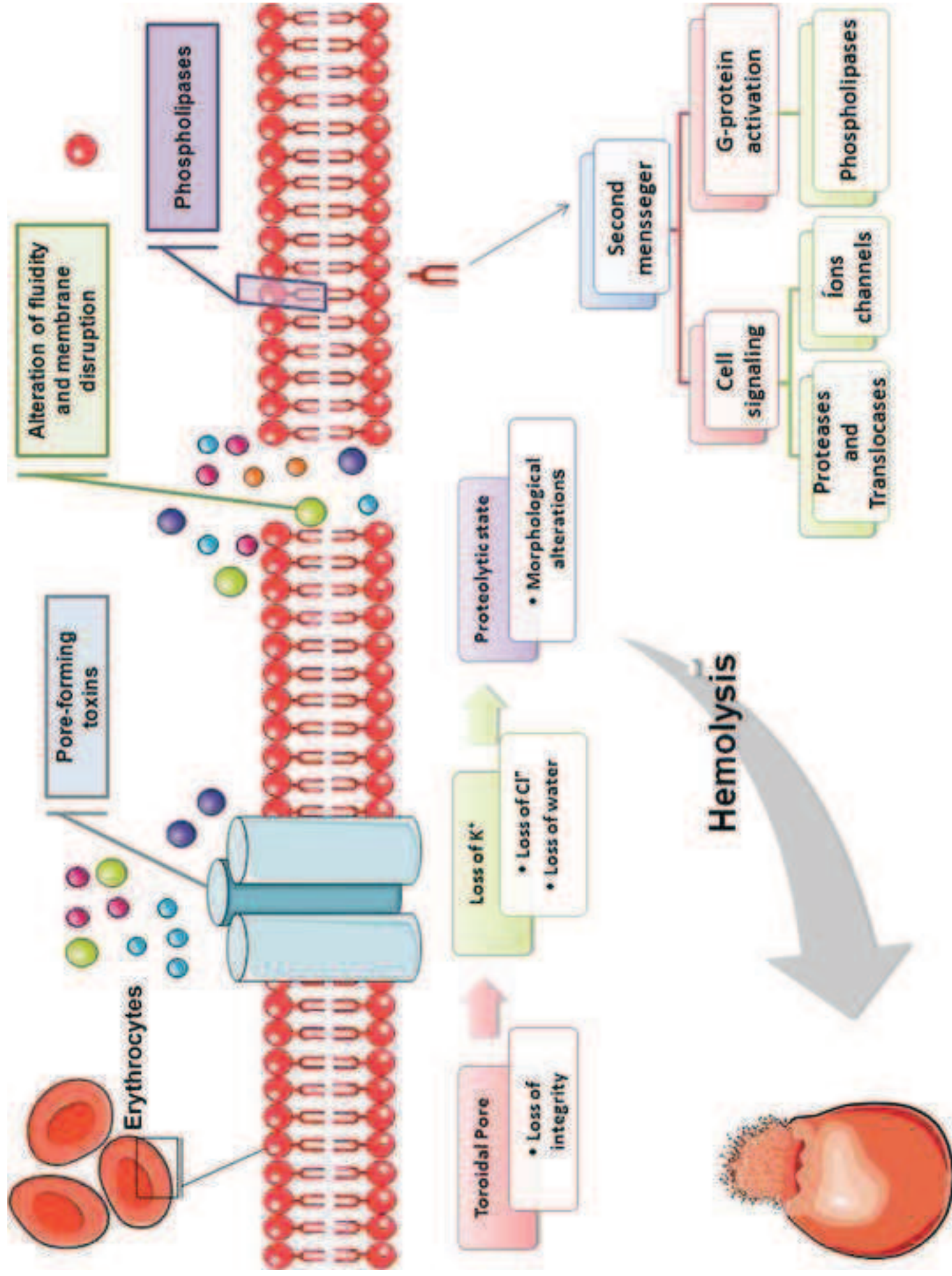
- Shiomi, K., Takamiya, M., Yamanaka, H., Kikuchi, T., Suzuki, Y., 1988. Toxins in the skin secretion of the oriental catfish (*Plotosus lineatus*): immunological properties and immunocytochemical identification of producing cells. *Toxicon* 26, 353-361.
- Silva, E.C., Camargos, T.S., Maranhao, A.Q., Silva-Pereira, I., Silva, L.P., Possani, L.D., Schwartz, E.F., 2009a. Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. *Toxicon* 54, 252-261.
- Silva, L.C., Futerman, A.H., Prieto, M., 2009b. Lipid raft composition modulates sphingomyelinase activity and ceramide-induced membrane physical alterations. *Biophys J* 96, 3210-3222.
- Singletary, E.M., Rochman, A.S., Bodmer, J.C., Holstege, C.P., 2005. Envenomations. *Med Clin North Am* 89, 1195-1224.
- Skals, M., Jorgensen, N.R., Leipziger, J., Praetorius, H.A., 2009. Alpha-hemolysin from *Escherichia coli* uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4030-4035.
- Smedley, J.G., 3rd, Fisher, D.J., Sayeed, S., Chakrabarti, G., McClane, B.A., 2004. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152, 183-204.
- Smither, S.J., Hill, J., van Baar, B.L., Hulst, A.G., de Jong, A.L., Titball, R.W., 2007. Identification of outer membrane proteins of *Yersinia pestis* through biotinylation. *J Microbiol Methods* 68, 26-31.
- Soares, A.M., Andriao-Escarso, S.H., Bortoleto, R.K., Rodrigues-Simioni, L., Arni, R.K., Ward, R.J., Gutierrez, J.M., Giglio, J.R., 2001a. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops pirajai* snake venom. *Arch Biochem Biophys* 387, 188-196.
- Soares, A.M., Giglio, J.R., 2003. Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon* 42, 855-868.
- Soares, A.M., Mancin, A.C., Cecchini, A.L., Arantes, E.C., Franca, S.C., Gutierrez, J.M., Giglio, J.R., 2001b. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A(2) subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 877-888.
- Soares, M.R., Azevedo, C.S., De Maria, M., 2002. [Scorpionism in Belo Horizonte, MG: a retrospective study]. *Rev Soc Bras Med Trop* 35, 359-363.
- Solley, G.O., 1990. Allergy to stinging and biting insects in Queensland. *Med J Aust* 153, 650-654.
- Solley, G.O., Vanderwoude, C., Knight, G.K., 2002. Anaphylaxis due to Red Imported Fire Ant sting. *Med J Aust* 176, 521-523.
- Stafford, C.T., Hoffman, D.R., Rhoades, R.B., 1989. Allergy to imported fire ants. *South Med J* 82, 1520-1527.
- Strichartz, G., Rando, T., Wang, G.K., 1987. An integrated view of the molecular toxinology of sodium channel gating in excitable cells. *Annu Rev Neurosci* 10, 237-267.
- Swanson, D.L., Vetter, R.S., 2005. Bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. *N Engl J Med* 352, 700-707.
- Tajima, A., Iwase, T., Shinji, H., Seki, K., Mizunoe, Y., 2009. Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect Immun* 77, 327-334.
- Takasaki, C., Fukumoto, M., 1989. Phospholipases B from Japanese yellow hornet (*Vespa xanthoptera*) venom. *Toxicon* 27, 449-458.

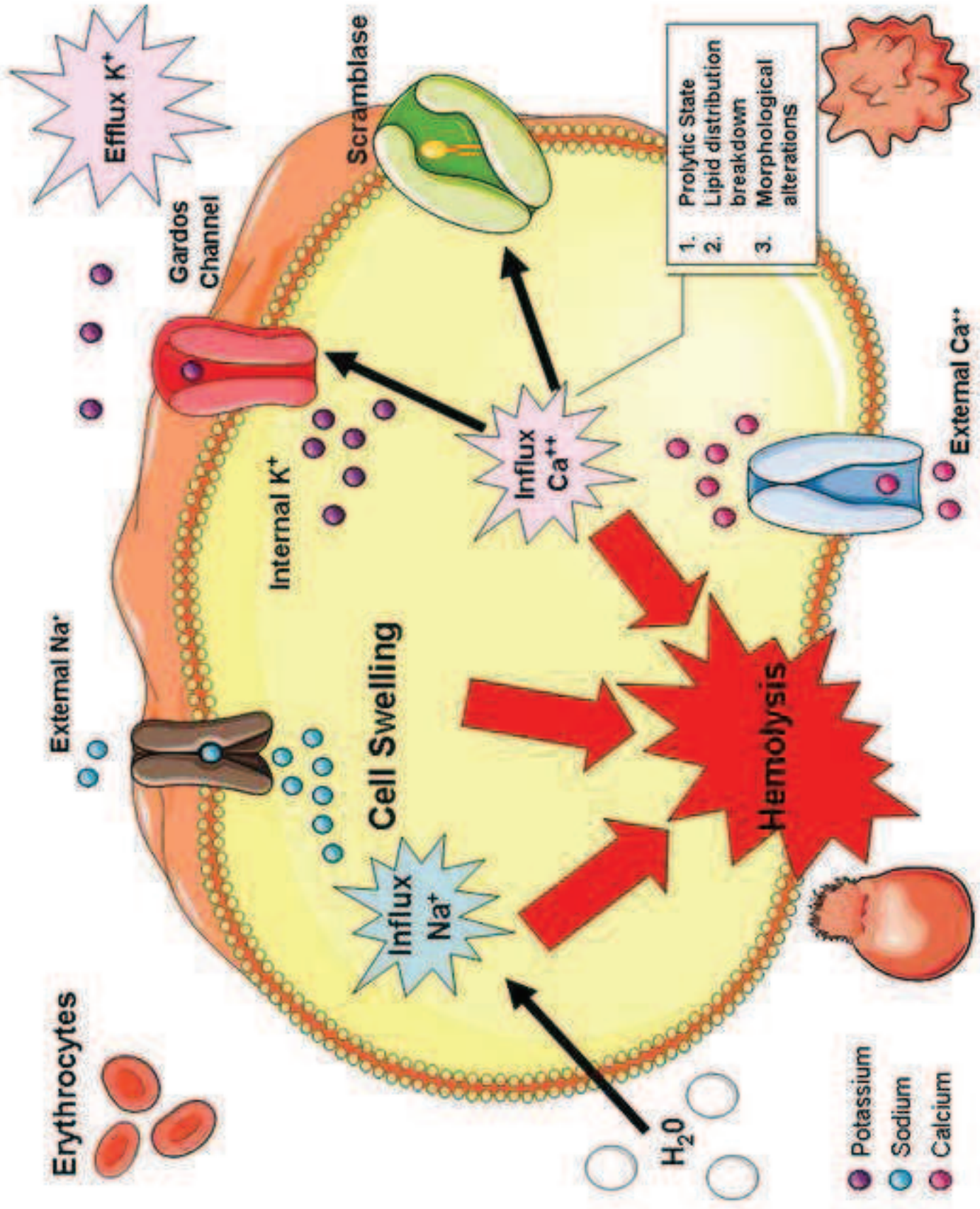
- Tambourgi, D.V., Goncalves-de-Andrade, R.M., van den Berg, C.W., 2010. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. *Toxicon* 56, 1113-1119.
- Tambourgi, D.V., Magnoli, F.C., Von Eickstedt, V.R., Benedetti, Z.C., Petricevich, V.L., da Silva, W.D., 1995. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. *J Immunol* 155, 4459-4466.
- Tambourgi, D.V., Morgan, B.P., de Andrade, R.M., Magnoli, F.C., van Den Berg, C.W., 2000. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. *Blood* 95, 683-691.
- Tavares, F.L., Peichoto, M.E., Rangel, D.M., Barbaro, K.C., Cirillo, M.C., Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S., 2011. *Loxosceles gaucho* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. *Hum Exp Toxicol*.
- Tavares, F.L., Sousa-e-Silva, M.C., Santoro, M.L., Barbaro, K.C., Rebecchi, I.M., Sano-Martins, I.S., 2004. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. *Hum Exp Toxicol* 23, 477-486.
- Tejuca, M., Serra, M.D., Ferreras, M., Lanio, M.E., Menestrina, G., 1996. Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolytic isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 35, 14947-14957.
- Titball, R.W., 1993. Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev* 57, 347-366.
- Trevisan-Silva, D., Gremski, L.H., Chaim, O.M., da Silveira, R.B., Meissner, G.O., Mangili, O.C., Barbaro, K.C., Gremski, W., Veiga, S.S., Senff-Ribeiro, A., 2010. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie* 92, 21-32.
- Tso, J.Y., Siebel, C., 1989. Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. *Infect Immun* 57, 468-476.
- Ueda, A., Suzuki, M., Honma, T., Nagai, H., Nagashima, Y., Shiomi, K., 2006. Purification, properties and cDNA cloning of neoverrucotoxin (neoVTX), a hemolytic lethal factor from the stonefish *Synanceia verrucosa* venom. *Biochim Biophys Acta* 1760, 1713-1722.
- Ullah, A., de Giuseppe, P.O., Murakami, M.T., Trevisan-Silva, D., Wille, A.C., Chaves-Moreira, D., Gremski, L.H., da Silveira, R.B., Sennf-Ribeiro, A., Chaim, O.M., Veiga, S.S., Arni, R.K., 2011. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 67, 234-236.
- Valdez-Cruz, N.A., Batista, C.V., Possani, L.D., 2004a. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur J Biochem* 271, 1453-1464.
- Valdez-Cruz, N.A., Batista, C.V., Zamudio, F.Z., Bosmans, F., Tytgat, J., Possani, L.D., 2004b. Phaiodotoxin, a novel structural class of insect-toxin isolated from the venom of the Mexican scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur J Biochem* 271, 4753-4761.
- Valdez-Cruz, N.A., Segovia, L., Corona, M., Possani, L.D., 2007. Sequence analysis and phylogenetic relationship of genes encoding heterodimeric phospholipases A2 from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Gene* 396, 149-158.
- Vecsey-Semjen, B., Kwak, Y.K., Høgbom, M., Møllby, R., 2010. Channel-forming abilities of spontaneously occurring alpha-toxin fragments from *Staphylococcus aureus*. *J Membr Biol* 234, 171-181.

- 1 Veiga, A.B., Blochtein, B., Guimaraes, J.A., 2001. Structures involved in production,
2 secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua*
3 (*Lepidoptera*, *Saturniidae*). *Toxicon* 39, 1343-1351.
- 4 Veiga, A.B., Pinto, A.F., Guimaraes, J.A., 2003. Fibrinogenolytic and procoagulant
5 activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb*
6 *Res* 111, 95-101.
- 7 Veiga, A.B., Ribeiro, J.M., Guimaraes, J.A., Francischetti, I.M., 2005. A catalog for the
8 transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*:
9 identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and
10 hemorrhagic syndrome. *Gene* 355, 11-27.
- 11 Veiga, S.S., Feitosa, L., dos Santos, V.L., de Souza, G.A., Ribeiro, A.S., Mangili, O.C.,
12 Porcionatto, M.A., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Brentani, R.R., Gremski, W., 2000.
13 Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem J* 32, 397-
14 408.
- 15 Viero, G., Gropuzzo, A., Joubert, O., Keller, D., Prevost, G., Dalla Serra, M., 2008. A
16 molecular pin to study the dynamics of beta-barrel formation in pore-forming toxins on
17 erythrocytes: a sliding model. *Cell Mol Life Sci* 65, 312-323.
- 18 Walls, R.S., Czarny, D., Solley, G., 1983. Bee venom immunotherapy. *Med J Aust* 2,
19 606.
- 20 Ward, R.J., Alves, A.R., Ruggiero Neto, J., Arni, R.K., Casari, G., 1998. A
21 SequenceSpace analysis of Lys49 phospholipases A2: clues towards identification of
22 residues involved in a novel mechanism of membrane damage and in myotoxicity.
23 *Protein Eng* 11, 285-294.
- 24 Ward, R.J., Chioato, L., de Oliveira, A.H., Ruller, R., Sa, J.M., 2002. Active-site
25 mutagenesis of a Lys49-phospholipase A2: biological and membrane-disrupting
26 activities in the absence of catalysis. *Biochem J* 362, 89-96.
- 27 Warrell, D.A., 2002. Bites of venomous snakes. *N Engl J Med* 347, 1804-1805; author
28 reply 1804-1805.
- 29 Warrell, D.A., Fenner, P.J., 1993. Venomous bites and stings. *Br Med Bull* 49, 423-439.
- 30 Wasserman, G.S., 1988. Wound care of spider and snake envenomations. *Ann Emerg*
31 *Med* 17, 1331-1335.
- 32 Watala, C., Kowalczyk, J.K., 1990. Hemolytic potency and phospholipase activity of
33 some bee and wasp venoms. *Comp Biochem Physiol C* 97, 187-194.
- 34 White, S.P., Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H., Sigler, P.B., 1990. Crystal
35 structure of cobra-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state
36 analogue. *Science* 250, 1560-1563.
- 37 Williams, S.T., Khare, V.K., Johnston, G.A., Blackall, D.P., 1995. Severe intravascular
38 hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. A report of two cases
39 and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 104, 463-467.
- 40 Wu, W.G., Tjong, S.C., Wu, P.L., Kuo, J.H., Wu, K., 2010. Role of heparan sulfates
41 and glycosphingolipids in the pore formation of basic polypeptides of cobra cardiotoxin.
42 *Adv Exp Med Biol* 677, 143-149.
- 43 Yamada, A., Tsukagoshi, N., Udaka, S., Sasaki, T., Makino, S., Nakamura, S., Little,
44 C., Tomita, M., Ikezawa, H., 1988. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia*
45 *coli* of the gene coding for sphingomyelinase of *Bacillus cereus*. *Eur J Biochem* 175,
46 213-220.
- 47 Yamamoto, C., Tsuru, D., Oda-Ueda, N., Ohno, M., Hattori, S., Kim, S.T., 2001.
48 *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom induces human erythrocyte lysis through
49 enzymatic lipolysis, complement activation and decreased membrane expression of
50 CD55 and CD59. *Pharmacol Toxicol* 89, 188-194.

- Yang, H., Xu, X., Ma, D., Zhang, K., Lai, R., 2008. A phospholipase A1 platelet activator from the wasp venom of *Vespa magnifica* (Smith). *Toxicon* 51, 289-296.
- Yew, W.S., Khoo, H.E., 2000. The role of tryptophan residues in the hemolytic activity of stonustoxin, a lethal factor from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Biochimie* 82, 251-257.
- Yew, W.S., Kolatkar, P.R., Kuhn, P., Khoo, H.E., 1999. Crystallization and preliminary crystallographic study of stonustoxin, a protein lethal factor isolated from the stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *J Struct Biol* 128, 216-218.
- Zaharenko, A.J., Ferreira, W.A., Jr., de Oliveira, J.S., Konno, K., Richardson, M., Schiavon, E., Wanke, E., de Freitas, J.C., 2008a. Revisiting cangitoxin, a sea anemone peptide: purification and characterization of cangitoxins II and III from the venom of *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon* 51, 1303-1307.
- Zaharenko, A.J., Ferreira, W.A., Jr., Oliveira, J.S., Richardson, M., Pimenta, D.C., Konno, K., Portaro, F.C., de Freitas, J.C., 2008b. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 3, 219-225.







RESULTADOS

3. RESULTADOS

A - Item 1: Identificação de um efeito hemolítico direto dependente da atividade catalítica Induzida pela Fosfolipase-D (Toxina dermonecrótica) do veneno da aranha-marrom.

J Cell Biochem. 2009 Jul 1;107(4):655-66.

Chaves-Moreira D, Chaim OM, Sade YB, Paludo KS, Gremski LH, Donatti L, de Moura J, Mangili OC, Gremski W, da Silveira RB, Senff-Ribeiro A, Veiga SS.

Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

As aranhas marrons têm distribuição mundial e são a causa de problemas de saúde conhecidos como loxoscelismo. Foram observadas lesões necróticas em torno da picada e sinais sistêmicos como a insuficiência renal, DIC, e hemólise nas vítimas do acidente com essas aranhas. Neste trabalho nós estudamos o mecanismo molecular pelo qual a toxina recombinante, bioquimicamente caracterizada como fosfolipase-D, desencadeia a hemólise direta (complemento independente). Eritrócitos humanos tratados com a toxina mostraram hemólise direta de uma forma dependente da dose e do tempo de exposição, bem como alterações morfológicas no tamanho e forma das células. Os eritrócitos de coelho, humanos e ovelhas são mais suscetíveis do que os de cavalo. A hemólise não é dependente do grupo ABO ou do sistema Rh. Análises confocal e FACS usando anticorpos contra proteína a toxina ou a GFP-fosfolipase-D mostrou ligação direta dessa toxina sobre a membrana dos eritrócitos. Além disso, os eritrócitos tratados com a toxina reagiram com anexina-V e mostraram também alterações em seu perfil de microdomínios lipídicos. Alguns quelantes de íons divalentes inibiram a hemólise evocada pela fosfolipase-D, que possui um magnésio no seu domínio catalítico. Os quelantes testados foram mais eficazes do que PMSF (inibidor de serino-protease) que não teve efeito sobre a hemólise. Uma mutação sítio dirigida no domínio catalítico (histidina 12 pela alanina) inibiu completamente a hemólise e as alterações morfológicas dos eritrócitos (mas não a capacidade da toxina de ligação da membrana), suportando a idéia de que a atividade catalítica está envolvida na

hemólise e nas alterações celulares, mas não na ligação da toxina sobre as células. Os resultados fornecem evidências de que o veneno de *L. intermedia* e a fosfolipase D desencadeiam hemólise direta das células humanas do sangue de uma maneira catalítico-dependente.

B - Item 2: A relação entre cálcio e o metabolismo de fosfolípidos da membrana plasmática na hemólise induzida pela toxina fosfolipase-D do veneno da aranha-marrom.

J Cell Biochem. 2011 May 16. doi: 10.1002/jcb.23177.

Chaves-Moreira D, Souza FN, Fogaça RT, Mangili OC, Gremski W, Senff-Ribeiro A, Chaim OM, Veiga SS.

Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

A fosfolipase-D presente no veneno da aranha marrom pertence a uma família de toxinas caracterizadas como potentes agentes bioativos. Elas têm sido envolvidas em vários aspectos da fisiopatologia das células, incluindo resposta inflamatória, agregação plaquetária, hiperativação de células endoteliais, alterações renais, e hemólise. O mecanismo molecular pelo qual essas toxinas causam hemólise está sob investigação; dados da literatura têm sugerido que a catálise enzimática é necessária para as atividades biológicas desencadeadas pela toxina. No entanto, o mecanismo pelo qual fosfolipase-D desencadeia a hemólise direta em eritrócitos humanos não foi completamente determinado. Para avaliar como a atividade da fosfolipase-D provoca a hemólise, examinou-se o impacto das fosfolipases-D recombinantes sobre células vermelhas do sangue. Utilizando seis diferentes fosfolipase-D recombinantes purificadas obtidas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno, demonstramos que há uma correlação direta entre efeito hemolítico e atividade enzimática. Estudando a LiRecDT1, uma potente toxina hemolítica e fosfolipase-D recombinante, determinou-se que a toxina degrada esfingomielina, lisofosfatidilcolina e liso-fator de ativação plaquetária. Além disso, determinou-se que a toxina é capaz de degradar também os fosfolípidios do extrato de eritrócitos humanos, bem como os fosfolípidios da membrana eritrocitária. Os produtos da degradação da esfingomielina e lisofosfatidilcolina pelo tratamento com a LiRecDT1 causam hemólise dos eritrócitos humanos. Esta hemólise, dependente dos produtos do metabolismo de fosfolípidios, é também dependente da concentração de íons de cálcio, porque o percentual de hemólise aumentada com o

aumento da dose de cálcio no meio. O tratamento com a fosfolipase-D recombinante estimula o influxo de cálcio para dentro das células que foi detectado por uma sonda fluorescente sensível cálcio (Fluo-4). Este influxo de cálcio mostrou ser mediado por canal, em vez que a entrada de íons Ca^{2+} foi inibida por inibidores dos canais de cálcio do tipo-L, mas não por inibidores de canais de cálcio do tipo-T ou por bloqueador de canal de sódio ou por inibidor específico de canais de potássio ativados por cálcio. Finalmente, essa inibição de hemólise induzida pelo tratamento com fosfolipase-D ocorreu de forma dependente da concentração de bloqueadores dos canais de cálcio tipo-L, como nifedipina e verapamil. Os dados fornecidos neste estudo sugerem que a fosfolipase-D do veneno da aranha marrom induz hemólise de eritrócitos humanos através do metabolismo de fosfolipídios de membrana, como a esfingomielina e lisofosfatidilcolina, gerando produtos bioativos que estimulam um influxo de cálcio nas células vermelhas do sangue mediado por canal de cálcio do tipo-L.

C - Item 3: Atividade hemolítica das toxinas de animais peçonhentos: uma visão geral.

Toxicon. 2011 Jun 24. TOXCON-D-11-00258.

Daniele Chaves-Moreira, Larissa Magalhães Alvarenga, João Carlos Degraf Muzzi, Juliana de Moura, Silvio Sanches Veiga

Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

A maioria dos organismos venenosos são benignos e ambientalmente benéficos. Seus venenos são misturas ricas de moléculas que são naturalmente envolvidos na captura, morte e digestão das presas ou para proteção contra predadores. Ocasionalmente, as pessoas são envenenadas depois de uma picada acidental ou contato com estes venenos tóxicos, quee podem produzir lesões dolorosas ou efeitos sistêmicos significativos. Importantes síndromes clínicas são produzidos por espécimes do filo Arthropoda, Arachnida especificamente as classes (aranhas, escorpiões), Insecta (abelhas, vespas e lagartas) e as espécies marinhas, como anêmonas do mar e cnidários. Serpentes também estão envolvidas nos envenenamentos importante e às vezes letal. Estes animais possuem uma grande variedade de substâncias biologicamente ativas cujos mecanismos de ação são muitas vezes desconhecidos. Este artigo incidirá sobre os efeitos hemolíticos das toxinas e dos venenos brutos de alguns animais, assim como suas ações a nível celular. Uma compreensão dos mecanismos subjacentes ao “in vivo” facilita o entendimento dos efeitos tóxicos dessas substâncias e auxilia o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes contra envenenamentos e promove o desenvolvimento de ferramentas com aplicações biotecnológicas. Moléculas bioativas secretadas por organismos procariotas e eucariotas são importantes recursos para estudos de bioprospecção e para o desenvolvimento de tecnologia relacionada à produtos de cuidados terapêuticos e de saúde. Esta revisão irá descrever exemplos de tais compostos e suas atividades.

D - Item 4: Mecanismo molecular da atividade hemolítica da fosfolipase-D presente no veneno de *Loxosceles intermedia*.

Daniele Chaves-Moreira, Mariana Gabriel Magnone, Silvio Marques Zanatta, André Fully, Andrea Senff-Ribeiro, Olga Meiri Chaim, Silvio Sanches Veiga.

Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Nós investigamos o mecanismo pelo qual a fosfolipase-D presente no veneno da aranha marrom induz a injúria, a morte e a ruptura dos eritrócitos. Dados prévios demonstraram que o veneno bruto de *L. intermedia* e a toxina recombinante LiRecDT1, através da degradação de fosfolipídios da membrana promovem diretamente o encolhimento celular acompanhado de alterações morfológicas, *blebbing* de membrana, influxo de cálcio, ativação de proteases, agregação de *lipid rafts* e exposição da fosfatidilserina, acarretado na morte e ruptura dos eritrócitos. A externalização de fosfatidilserina na superfície do eritrócito é reconhecida por macrófagos. Além disso, essa exposição pode ativar a via clássica do sistema complemento e dessa forma promover também hemólise complemento dependente que aumenta a gravidade do efeito. Duas vias de sinalização ativadas por metabólitos lipídicos foram investigadas nesse trabalho a via do ácido lisofosfatídico (LPA) e a via da ceramida-1-fosfato (C1P), já que a toxina recombinante é capaz de hidrolisar lisofosfatidilcolina (LPC) e esfingomielina (SM) e liberar os respectivos metabólitos. A primeira hipótese observada foi a atividade hemolítica do ácido lisofosfatídico através do seu receptor LPA2/LPA3 acoplado a proteína Gi e conseqüente abertura de canais de cálcio do Tipo-L. Já a segunda hipótese foi a da ceramida-1-fosfato que por sua vez é capaz de promover a ativação direta da Fosfolipase A₂ interna ao eritrócito. Dessa forma promovendo a liberação de ácido aracdônico que será metabolizado pela ciclooxigenase para a formação de mediadores eicosanóides como as prostaglandinas. A prostaglandina gerada é um conhecido mediador pró-inflamatório que promove a ativação de diversas enzimas citoplasmática, que podem induzir a morte e ruptura dos eritrócitos. Por outro lado, a C1P formada a partir da hidrólise de SM é metabolizada a ceramida pela atividade de uma fosfatase e transformada em esfingosina pela ceramidase, que por sua vez

será convertida em esfingosina-1-fosfato pela esfingosina-1-quinase. Esses metabólitos lipídicos são conhecidos efetores de inflamação, morte celular e hemólise. A ceramida e o cálcio ativam a *scramblase* que promove a externalização de fosfatidilserina e a calpaina que promove a degradação do citoesqueleto. Juntos desencadeiam o processo de morte do eritrócito, ou seja, alterações morfológicas e hemólise. Aparentemente, a inibição do transporte da S1P para o meio extracelular através do seu transportador, conhecido como ABCA1 não promoveu qualquer interferência na hemólise induzida pela fosfolipase D. Até o momento, acreditamos baseado nesses dados que o efeito hemolítico induzido pelas fosfolipases da aranha-marrom seja devido pela formação de LPA e C1P.

D.1 MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Reagentes

Os sais utilizados foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e as soluções preparadas para o uso nos eritrócitos tiveram pH (PHS-3B, Labmeter) e osmolaridade (“VAPRO 5520”, Wescor, Utah, EUA) ajustados. A triptona e extrato de levedura utilizados foram provenientes da HiMedia (Mumbai, India). A ampicilina foi adquirida da USB (Cleveland, OH, EUA). O IPTG, a Anexina V marcada com FITC, a Toxina Colérica marcada com Alexa Flúor-594, O Amplex Red kit de atividade enzimática e o Fluo4-AM foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O Soro Fetal Bovino foi adquirido da Cultilab (Campinas, Brasil) e o Tris Base adquirido da Gibco BRL (Bethesda, EUA). A Albumina de Soro Bovino (BSA), o ágar-ágar, o anti-IgG de coelho marcado com FITC, o Hepes, a Sucrose, todos os inibidores e a D-Glucose foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Os fosfolipídios foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). As placas (24 e 96 poços – Polysorp e Maxysorp) foram compradas da Nalge Nunc International Corporation (Naperville, IL, EUA).

Animais

Os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em “Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care). Os certificados de liberação para realização dos experimentos utilizando animais e humanos emitidos pelos respectivos Comitês de Ética em Experimentação (CEEa E CEP-BIOLÓGICAS “UFPR”) estão anexados ao final dessa dissertação. Neste trabalho, foram utilizados indivíduos adultos de *Loxosceles intermedia* coletados na cidade de Curitiba e região Metropolitana e de exemplares fornecidos pelo LIPAPE (Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos) da UFPR. Os camundongos suíços, coelhos neozelandeses e cavalos foram utilizados para a obtenção de 1mL de sangue nos ensaios de hemólise “*in vitro*”. Os coelhos neozelandeses também foram utilizados para a obtenção de soro hiperimune ao veneno de *Loxosceles intermedia*, assim como a toxina recombinante. Estes animais ficaram acomodados em condições de temperatura constante (21 ± 2 °C) e luminosidade controlada (12 horas de claridade e 12 horas de escuridão). Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Já dos cavalos saudáveis e de corrida, pertencentes ao Jockey Club do Paraná, Curitiba, foi apenas coletado sangue. O sangue de carneiro desfibrinado foi adquirido comercialmente da Newprov produtos para laboratório (Pinhais, PR, Brasil).

MÉTODOS

Extração de veneno loxoscélico por eletrochoque

O veneno de *Loxosceles intermedia* foi obtido de aranhas adultas em condições apropriadas e submetidas à eletrochoque de 15 volts no cefalotórax como descrito por Feitosa *et al.*, 1998. Após a coleta, o veneno foi diluído em PBS e mantido à temperatura de -80 °C até o momento do uso.

Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

A dosagem da concentração de proteínas presentes no veneno total e nas toxinas recombinantes foi realizada através do método de Azul de Coomassie, como descrito por Bradford, 1976. A absorbância foi obtida em 610nm em leitor ELISA (Meridian, ELx 800, Auto Reader Diagnostics inc, EUA).

Obtenção de eritrócitos humanos

A coleta de amostras de sangue periférico foi feita por punção de voluntários adultos e saudáveis, de acordo com os requisitos definidos pelo Comitê de Ética em Experimentação em Humanos (CEP-Biológicas). Todo o material estéril utilizado foi adquirido comercialmente (Agulhas e Seringas BD Plastipak®). O anticoagulante utilizado foi EDTA Na₂ 5% adquirido da Newprov Produtos para Laboratório (Pinhais, PR, Brasil), na proporção de 1 gota para cada mililitro de sangue.

Expressão de proteínas recombinantes a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia*

As toxinas utilizadas nesse trabalho foram obtidas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno como descrito em Chaim e colaboradores (2006); Da Silveira e colaboradores (2006 e 2007a) e Appel e colaboradores (2008). A seqüência do cDNA clonado está depositada no GenBank sob o número DQ218155 para LiRecDT1.

A toxina mutada foi obtida pelo método de PCR Megaprimer adaptado de Sambrook e Russell (2001) por Chaim e colaboradores (2011a). Basicamente o procedimento foi realizado em três etapas de PCR, com o intuito de introduzir uma mutação sítio dirigida na seqüência original da toxina LiRecDT1; a toxina mutada resultante foi nomeada LiRecDT1 H12A. A primeira etapa de PCR incluiu a mutação do primeiro resíduo de histidina na posição 12 da seqüência nucleotídica utilizando o *primer forward* T7, o qual se anela a porção 5' do vetor pSPORT, e o *primer reverse* especialmente desenhado P1H12A. O esquema da Nota 1 ilustra a seqüência nucleotídica original da toxina LiRecDT1 e a modificação introduzida.

A proteína recombinante LiRecDT1-GFP foi obtida por subclonagem como a construção prévia da LiRecDT1 (Chaim *et al.*, 2006). Nessa sequência foi adicionada a sequência da “green fluorescence protein” (EGFP) em pET-14b, usando-se a estratégia de *Blunt-Cut-Cut* em *NdeI* (pET-14b) e dois sítios *BamH I* (entre LiRecDT1, EGFP e o Vektor). O Resultado foi a construção de uma proteína de fusão com uma cauda “6x His-Tag” na região N-terminal, seguida da sequência da LiRecDT1 madura e da EGFP na região C-terminal.

Em resumo, os cDNAs codificantes para as proteínas maduras foram amplificados por PCR utilizando *primers* desenhados para conter sítios de restrição na extremidade 5' para *Xho I forward* e *BamH I reverse*. O produto de PCR foi, então, digerido com tais enzimas e subclonado em pET-14b digerido com as mesmas enzimas. Em seguida, as construções foram expressas como proteínas de fusão em *E. coli* BL21(DE3)pLysS quimio-competentes contendo etiqueta de histidinas (6x His Tag). Os clones obtidos tiveram suas seqüências confirmadas por sequenciamento de DNA.

Além disso, as colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas foram expandidas em 10 mL de meio líquido Luria Broth contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) e posteriormente utilizadas para inocular volumes maiores de meio LB (1000 mL). Estas culturas, em larga escala, foram mantidas a 37°C com aeração constante, até D.O.₅₅₀ = 0,5. A indução da expressão das toxinas foi realizada pela adição de IPTG 0.05 mM e as culturas foram incubadas por um período de 3 h½ a 30 °C (Chaim *et al.*, 2006, Da Silveira *et al.*, 2006 e 2007; Ribeiro *et al.*, 2007).

Purificação das proteínas LiRecDTs, LiRecDT1 H12A e LiRecDT1-GFP em resina Ni-NTA agarose

Após a indução da expressão das toxinas recombinantes em *E. coli* BL21(DE3)pLysS, as células foram sedimentadas por centrifugação e rompidas por criofratura com o auxílio de 40 mg de Lizosima (Sigma, St. Louis, MO, USA) em tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM), a quebra do DNA gênomico foi realizada mecanicamente. Após centrifugação adicional, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Ni-NTA agarose para a purificação da proteína recombinante de fusão, contendo a cauda de histidina (6x

His Tag). A coluna foi lavada exaustivamente em tampão de lavagem (fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 20 mM) e eluída em tampão de eluição (fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 250 mM). As frações obtidas foram analisadas por SDS/PAGE 12,5%, reunidas e dialisadas contra PBS. As toxinas recombinantes purificadas foram dosadas pelo método de Bradford, aliqüotadas e mantidas a -80°C até o momento do uso (Chaim *et al.*, 2006, da Silveira *et al.*, 2006 e 2007; Ribeiro *et al.*, 2007).

Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

As eletroforeses foram realizadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5% em condições redutoras e não redutoras como descrito por Laemmli e colaboradores (1970). Para observação das proteínas, os géis foram corados com azul de Coomassie 0,02% em metanol 50%, ácido acético 10% em água deionizada. Os géis foram mantidos nesta solução por vinte minutos em temperatura ambiente, sob agitação constante e descorados com sucessivas trocas de metanol 50% com ácido acético 10% em água destilada (Fairbanks *et al.*, 1971). Finalmente, utilizaram-se marcadores de massa molecular para avaliar a altura das proteínas purificadas. Os marcadores utilizados foram ovoalbumina (44 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), β -lactoglobulina (20 kDa), lisozima (15 kDa), inibidor de tripsina (5,6 kDa) e insulina (3,0 kDa) adquiridos da BioRad (Hercules, CA, EUA).

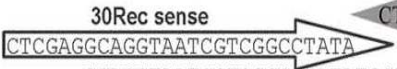
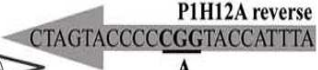
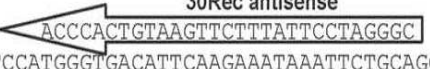
1	TCATGTTGCCGTACATTGTCCTAGTATTGGGGTGTGGAGCGTCTTGTCCCAGGCTGCTCAAACAGATGATGAAGAACGC
1	<u>M L P Y I V L V L G C W S V L S Q A A Q T D D E E R</u>
	30Rec sense  PIH12A reverse 
	CTCGAGGCAGGTAATCGTCGGCCTATA CTAGTACCCC <u>CGG</u> TACCATTTA A
81	GCAGGTAATCGTCGGCCTATATGGATCATGGGGCACATGGTAAATGCCATCGGTGAGATAGACGAGTTCGTGAACCTT
27	A G N R R P I W I M G H M V N A I G Q I D E F V N L
159	GGAGCAAACCTCCATCGAAACAGACGTGTCTTTCGATGACAATGCCAATCCTGAGTATACTTATCACGGCATTCCATGT
53	G A N S I E T D V S F D D N A N P E Y T Y H G I P C
237	GATTGTGGAAGGAATTGCAAGAAATATGAGAATTTTAACGATTTTCTGAAAGGTCTCCGAAGCGCCACAACACCTGGT
79	D C G R N C K K Y E N F N D F L K G L R S A T T P G
315	AATTCAAAGTATCAGGAAAACTGGTCTTAGTCGTGTTGACTTAAAGACAGGTAGCCTCTACGATAATCAAGCCAAC
105	N S K Y Q E K L V L V V F D L K T G S L Y D N Q A N
393	GACGCCGGAAGAAATTGGCGAAGAATCTCTTACAACATTACTGGAACAATGGCAATAATGGTGAAGAGCATACATA
131	D A G K K L A K N L L Q H Y W N N G N N G G R A Y I
471	GTGTTATCGATCCCAGACCTTAATCATTATCCACTGATTAAAGGATTCAAAGACCAGCTTACAAAGGACGGACACCCA
157	V L S I P D L N H Y P L I K G F K D Q L T K D G H P
549	GAGTTGATGGACAAAGTTGGACACGACTTCTCCGAAACGACGACATCGGCGACGTTGGAAGCTTACAAGAAAGCA
183	E L M D K V G H D F S G N D D I G D V G K A Y K K A
627	GGAATAACTGGCCATATTTGGCAGAGCGATGGTATCACCAACTGTTTACCACGTGGCCTTAGTCGTGAACGCAGCT
209	G I T G H I W Q S D G I T N C L P R G L S R V N A A
705	GTGGCAAACAGAGATTCCGCAAACGATTCAATTAACAAAGTGTACTACTGGACAGTGGACAAGCGCTCAACGACCAGA
235	V A N R D S A N G F I N K V Y Y W T V D K R S T T R
783	GATGCACTTGATGCTGGAGTTGACGGCATAATGACCAACTACCCGGATGTTATCACTGATGTTCTCAACGAAGCCGCA
261	D A L D A G V D G I M T N Y P D V I T D V L N E A A
	30Rec antisense 
861	TACAAGAAGAAATTCCGAGTTGCCACATACGACGAAAAATCCATGGGTGACATTCAAGAAATAAATTCTGCAGGTTGAT
287	Y K K K F R V A T Y D E N P W V T F K K *
939	TGTGGAACAAACATGGCAATCTGGATTTACGATTTTCATTGAACTTTGTTGAAAAACCAATTTGATGCGAAAACT
1017	AAAACTATGCACTATGGAAGCTTTGTTCAAAATATTGTTTGTATTATTGTAACATGTTTGAAAAAGTATTTTCA
1095	GAAATAAATTTTGATCCATGTAAAAA

Tabela 6: Sequência nucleotídica da toxina LiRecDT1 clonada a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* e a dedução da sua sequência aminoacídica. As setas brancas mostram a posição do anelamento com os primers (30 Rec sense) e (30 Rec antisense). A seta cinza ilustra o primer reverse, que inclui o códon da substituição na posição 12 na sequência de aminoácidos, originando a LiRecDT1 H12A (abaixo da linha, a Alanina na posição da Histidina) produzida por mutagênese pelo método do Megaprimer. *Corresponde ao Códon de parada. Modificado a partir de Chaim *et al.*, 2011.

Dose-resposta e tempo-dependência da atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1, LiRecDT1 H12A e veneno de *L. intermedia*

O ensaio hemolítico foi conduzido como descrito por Harris e Phoenix, 1997. Essencialmente, 1 mL de sangue foi lavado três vezes em Tampão Tris/Sucrose (Sucrose 250 mM, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 280 mOsm/kg H₂O) e centrifugados a 2000g por 3 minutos. Em seguida, foram ressuspensos no mesmo tampão para se obter uma concentração inicial de eritrócitos de aproximadamente 0.05%, correspondente a 5x10⁸ células/mL. Para se obter essa diluição, 250 µl da suspensão de eritrócitos lavados foram diluídos em 6 ml de água destilada e a absorbância lida a 550nm. O resultado foi obtido utilizando-se a equação abaixo, com a finalidade de se determinar o volume para o qual a suspensão inicial deveria ser diluída para se obter a concentração desejada:

$$\text{Volume final} = \frac{\text{Volume inicial} \times A_{550nm}}{0,210}$$

O controle positivo constituiu-se de 100% de hemólise, a qual foi produzida com uma solução de 0,1% (v/v) Triton X-100 por 60 minutos à 37 °C. As alíquotas de 200 µL da suspensão de eritrócitos normalizada (perfazendo um total de 1x10⁸ células) foram utilizadas conjuntamente com 200 µL da solução de tratamento. As soluções de tratamento foram compostas de várias concentrações de veneno e das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A separadamente (zero, 0,025, 0,25, 2,5 e 25µg/mL). As misturas resultantes foram incubadas a 37 °C na B.O.D, sob agitação delicada e constante em “roda mecânica”. Após os tempos de tratamento desejados (0, 4, 8, 16 e 24 horas), as suspensões foram centrifugadas por 3 minutos, a 2000g, a 4°C e a absorbância da hemoglobina livre no sobrenadante obtida em 550nm utilizando-se leitor ELISA. Em todos os casos, os níveis de hemólise foram determinados em porcentagem em relação ao controle positivo (Hemólise 100%). O Controle negativo foi obtido apenas com tampão e eritrócitos, em que não houve hemólise de fundo significativa.

Inibição da atividade hemolítica direta da toxina recombinante LiRecDT1

Estes ensaios foram realizados como descrito no item-1, porém 25 µg/mL da toxina LiRecDT1 foram incubados com os inibidores (Sigma) e foram adicionados e mantidos em repouso por 60 minutos à 37°C. Em seguida, foram adicionados os eritrócitos e incubados homogeneizando à 37 °C em B.O.D por 24 horas. Os controles negativos também foram incubados com tampão e inibidores enzimáticos para verificar qualquer interferência nos brancos.

Avaliação da interferência dos sistemas ABO e Rh na hemólise direta

O ensaio hemolítico foi conduzido como descrito por Harris e Phoenix, 1997. O procedimento foi o mesmo descrito no item 1 utilizando-se o tampão Tris/Sucrose. No entanto, foram utilizados eritrócitos lavados dos Tipos A⁺, B⁺, O⁺, O⁻ e AB⁺ previamente fenotipados em suspensões de 5x10⁸ células/mL. Estas células (200µL) foram incubadas com 25 µg/mL da toxina LiRecDT1 por 24 horas a 37 °C. Em seguida, foram centrifugadas e a absorbância do sobrenadante obtida em 550 nm. Foram aferidos também os controles negativos e positivos para cada tipo sanguíneo separadamente.

Verificação da atividade hemolítica direta sobre eritrócitos de diferentes animais

Este ensaio hemolítico também foi conduzido como descrito por Harris e Phoenix, 1997. O procedimento foi o mesmo descrito anteriormente no item 1, utilizando-se o tampão Tris/Sucrose. Foram lavados 1 mL de sangue de camundongo, cavalo, carneiro, coelho e humano e as respectivas suspensões a 5x10⁸ células/mL obtidas como já descrito. Utilizou-se 200 µL dessas soluções (1x10⁸ células), que então foram incubadas com 25 µg/mL da toxina LiRecDT1 por 24 horas a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e a absorbância do sobrenadante obtido em 550 nm. Foram aferidos também os controles negativos e positivos para cada animal separadamente.

Análise morfológica dos eritrócitos

As células vermelhas do sangue foram lavadas três vezes em Tampão Ringer-NaCl (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 32 mM Hepes, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, pH 7.4, 300 mOsm/kg H₂O) e ressuspensas na mesma solução para se obter uma concentração de eritrócitos de aproximadamente de 0.05%, ou seja, a concentração foi ajustada para 5x10⁸ células/mL. Aliquotas de 200 µL da suspensão de eritrócitos, que corresponde à 1x10⁸ células, foram incubadas conjuntamente com 200 µL da solução de tratamento. As soluções de tratamento foram compostas por 5 µg/mL das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e do veneno de *L. intermedia* separadamente. As misturas resultantes foram incubadas a 37 °C em B.O.D, sob agitação delicada e constante em “roda mecânica”. Após os tempos de tratamento desejados (0, 4, 8, 16 e 24 horas), as células foram observadas e fotografadas usando-se microscópio invertido Leica-DMIL (Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma máquina digital Cybershot Sony 6.1 megapixels, como preconizado por Udden, 2005.

Análise ultraestrutural dos eritrócitos

O processamento dos eritrócitos para análise ultraestrutural foi executado como descrito por Chung e colaboradores (2007). Eritrócitos recém coletados foram lavados três vezes em Tampão Ringer-NaCl e ressuspensos para se obter uma concentração inicial de eritrócitos de aproximadamente de 0.05% ou 5x10⁸ células/mL. Duzentos microlitros dessa suspensão foram incubados em separados, com 200 µL da solução de tratamento, compostas por 5 µg/mL das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e 5 µg/mL de veneno de *L. intermedia* por 0 e 8 horas a 37 °C em B.O.D sob agitação delicada e constante em “roda mecânica”. O processamento das amostras consistiu na remoção do tampão, lavagem dos eritrócitos em solução de Ringer e fixação, por 60 minutos, com glutaraldeído 2% em solução de Ringer, à 4°C sob agitação. Posteriormente, os eritrócitos foram novamente lavados e acomodados sobre lamínulas redondas e secos à temperatura ambiente. Em seguida, sofreram metalização em ouro e as lâminas foram observadas com Microscópio de Varredura JEOL J.S.M-6360 L.V. (Maryland, EUA).

Alteração do tamanho eritrocitário

O tamanho celular foi avaliado por citometria de fluxo utilizando-se um instrumento FACS-CALIBUR, Becton Dickinson, (New Jersey, USA), segundo Shumilina *et al.*, 2006. Para isso, sangue humano recém coletado foi lavado três vezes e ressuspensão em Tampão Ringer-NaCl para se obter uma concentração de eritrócitos de aproximadamente 1×10^6 células. Essa suspensão foi utilizada para a calibração do citometro de fluxo da seguinte forma, foi realizada a população normal dos eritrócitos e a padronização dos seus parâmetros normais. As amostras de eritrócitos consistiam em 1×10^6 células incubadas com 25 $\mu\text{g/mL}$ de toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e 25 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia*. As misturas resultantes ficaram incubadas a 37°C em B.O.D sob agitação delicada e constante em “roda mecânica”. Após o tempo de incubação desejado, 24 horas, as amostras foram analisadas (100.000 eventos) em função do tamanho das células (FSC). A análise estatística dos resultados e a confecção dos histogramas sobrepostos foram realizados utilizando-se o programa CellQuest.

Preparo das membranas “ghosts” dos eritrócitos

As membranas “ghost” dos eritrócitos foram obtidas como descritas no Item 2, onde os eritrócitos humanos recém coletados e após serem lavados repetidamente foram ressuspensos em solução hipotônica (NaH_2PO_4 “0,07g” e Na_2HPO_4 “0.64g” cerca de 5 mM por litro, PMSF 2mm, e pH 8,0). Esse lisado de RBCs foi então centrifugados (20,000g por 20 min à 4°C), procedimento repetido até se observar a precipitação de membranas esbranquiçadas, os “ghosts” de eritrócitos, obtidas pela lise das células e extravasamento do seu conteúdo interno (livre de hemoglobina). A determinação da concentração protéica foi realizada utilizando-se o método de Bradford, como descrito anteriormente.

Avaliação do Influxo de Cálcio

Os eritrócitos humanos (1×10^8 células/ml) foram preparadas em solução de Ringer (122,5 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 11mM glicose, 1mM NaH_2PO_4 , pH 7,4, 300mOsm/kg H_2O), contendo CaCl_2 2,5 mM e realizada de

acordo como descrito no Item 2. Primeiramente, os eritrócitos foram incubados com Fluo-4 AM (5µm) em tampão contendo PLURONIC F-127 (0,01%) por 30 min a 37°C. Esta sonda fluorescente tem uma alta afinidade de ligação com Ca^{2+} ($K_d = 345$ nM) e um aumento de intensidade muito grande de fluorescência em resposta a ligação com Ca^{2+} (> 100 vezes). Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com a Solução de Ringer e equilibradas para a de-esterificação por 30 min à temperatura ambiente. As células foram incubadas com 25 µg/ml de fosfolipase-D recombinante (LiRecDT1) e 25 µg/ml de fosfolipase-D mutada (LiRecDT1 H12A) por 5, 15, 30, 45, 60 e 120 min. Além disso, 1µM do ionóforo A23187 foi utilizado como controle positivo. Após a reação, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços em uma densidade de 1×10^6 células por poço em um volume total de 100 µl. A fluorescência resultante foi mensurada em fluorímetro Tecan Infiniit M200 (Tecan, Suíça), utilizando um comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão em 535nm. Além disso, eritrócitos humanos marcados com Fluo-4 foram sedimentados sobre lamínulas revestidas com *poli-L-lisina*, e imagens da entrada de cálcio foram realizadas usando o microscópio de fluorescência invertido (Carl Zeiss, Alemanha). Imagens individuais foram obtidas usando lente de 63X em óleo de imersão para o contraste diferencial de interface (DIC) e intensidade de fluorescência com câmera monocromática (AxioCam GRH, Carl Zeiss). Finalmente, o programa AxioVision foi utilizado para processamento das imagens e das medidas morfométricas no formato de imagem Zeiss (ZVI).

Análise da ligação da LiRecDT1-GFP

A análise da ligação da toxina LiRecDT1-GFP foi também observada por citometria de fluxo, em que os eritrócitos lavados (5×10^6 células) foram incubados com 25 µg/mL de toxina recombinante fluorescente (24 horas, 37 °C) num volume total de 400 µL de Ringer. As amostras foram diluídas em 1 mL de Ringer e então processadas. A presença de fluorescência (canal FL1-H), autofluorescência (células e tampão) e a possível ligação inespecífica da GFP (tratamento apenas com GFP) foram avaliadas. Finalmente, foram montadas lâminas e observadas em Microscópio Confocal como descrito no item 1.

Ensaio de imunofluorescência

Este ensaio teve como intuito verificar a ligação do veneno ou das toxinas recombinantes na membrana externa do eritrócito e se existe algum padrão característico de ligação na superfície da célula. Para isso, procedeu-se como Kalfa e colaboradores (2006) e Vojtová e colaboradores (2006), porém com algumas modificações como o descrito abaixo. Inicialmente, os eritrócitos lavados foram incubados por ½, 2, 4, 8, 16 e 24 horas na B.O.D a 37 °C, sob agitação, com 25 µg/mL das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A e com 25 µg/mL de veneno de *L. intermedia*. Posteriormente à incubação, as amostras foram lavadas com PBS (KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7.2, 304 mOsm/kg H₂O) e fixadas com Glutaraldeído 0,1% (EMS, Washington, EUA) em PBS por 10 minutos à 4°C em suspensão e em movimento. Após a fixação, os radicais aldeídicos foram bloqueados com Glicina 0,1 M, 2% SFB e 1 mg/ml de BSA em PBS por 60 minutos. Essas amostras foram, então, lavadas com PBS acrescido de 1 mg/ml de BSA.

Para detecção do veneno de *L. intermedia*, assim como de cada uma das toxinas recombinantes, foram utilizados anticorpos policlonais obtidos de coelhos, hiperimunizados com 10 µg/ml de veneno bruto de *L. intermedia* ou com 10 µg/ml da toxina recombinante LiRecDT1, produzida pelo Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de venenos - UFPR (Luciano *et al.*, 2004). Como anticorpo secundário, se empregou um anti-IgG de coelho conjugado com FITC na diluição de 1:250. Foram incubados com os eritrócitos, anti-veneno (α-Vn) e anti-LiRecDT1 (α-DT1) diluídos em PBS/BSA, por 2 horas em temperatura ambiente e sob homogeneização. Posteriormente, as amostras foram lavadas novamente com tampão PBS/BSA e, então, incubadas com anticorpo secundário anti-coelho (α-IgG de coelho) conjugado com FITC por 60 minutos, no escuro. As amostras foram lavadas novamente com PBS e 100 µL de cada amostra foi acomodada em contato (gota espessa) com as lâminas. Por precaução, foram utilizadas lâminas brancas (GLASS TÉCNICA) que não apresentam autofluorescência e previamente processadas com 200 µL de *poli-L-lisina* (50 µg/mL) por 1 hora. A utilização da *poli-L-lisina* se faz necessária devido à baixa aderência dos eritrócitos ao vidro (células de ancoragem independente) e que, por interações eletrostáticas, se ligam à *poli-L-lisina*, fixando-se na lâmina.

Em seguida foram mergulhadas rapidamente em PBS para retirada dos eritrócitos livres. Para finalizar, as lâminas foram montadas com 50 µL de Fluormont G (2:1 em PBS), vedadas com esmalte isento de formol e observadas em microscópio confocal Radiance 2100 (BioRad), acoplado a um microscópio de fluorescência (NIKON ECLIPSE 800). Como controle das reações, se empregou eritrócitos sem tratamento e sem anticorpos. Da mesma forma, foi realizado controle de eritrócitos não tratados com as proteínas, mas expostos aos anticorpos primários e secundários para verificar a especificidade dos anticorpos. Empregou-se também, os eritrócitos com a omissão dos anticorpos primários.

A quantificação desta ligação foi realizada adicionalmente por citometria de fluxo utilizando o mesmo procedimento de imunomarcação descrito para microscopia confocal, porém com as células em suspensão.

Ensaio para a marcação de microdomínios lipídicos

Neste ensaio foi utilizado o sistema *Vybrant Lipid Raft Labeling Kits* (Invitrogen, USA), o qual se baseia na alta afinidade da subunidade-B da toxina do cólera (CT-B) por Monossialogangliosídeo (GM1), que também está presente em grande quantidade nos microdomínios lipídicos.

Desse modo, eritrócitos recém coletados foram lavados e 1×10^8 células ressuspendas em 2 mL de solução Ringer contendo 2 µL de uma solução 1mg/mL de “CT-B” conjugado com Alexa Flúor 594. A mistura foi incubada por 10 minutos à 4°C. Em seguida, as células foram lavadas delicadamente com tampão Ringer. Posteriormente, foi realizada a ligação cruzada com os microdomínios marcados com CT-B, utilizando o anticorpo anti-CT-B, na diluição 1:1000 (2 µL de anticorpo “1 mg/mL” em 2mL), e incubando-se por 15 minutos à 4°C .

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas e lavadas com solução de Ringer, e os eritrócitos fixados com glutaraldeído 0,1% e bloqueados como descrito anteriormente. Finalmente, foram montadas as lâminas para visualização dos eritrócitos marcados.

Análise da exposição de fosfatidilserina

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Amarantes-Mendes (1998) em que os eritrócitos recém-coletados e lavados 1×10^8 células. Cem microlitros da amostra foram incubados com 25 $\mu\text{g/mL}$ das toxinas recombinantes LiRecDT1 e LiRecDT1 H12A assim como com 25 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia* por 4 horas. Após incubação foram lavados e ressuspensos em tampão de ligação para anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , pH 7.4) e adicionados 5 μL de anexina V marcada com fluoresceína (FITC) (Invitrogen – USA) por 30 minutos, protegido da luz, em temperatura ambiente. Essas amostras devem ser mantidas protegidas da luz em temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 400 μL de tampão de ligação, misturando-se gentilmente, mantidos sobre gelo até o momento da leitura.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) sendo as médias comparadas “método Paramétrico Tukey”, através dos programas GraphPad Instant e Prisma (versão 3.0 / Windows 2000). Os valores \pm erro padrão da média (EPM) foram utilizados (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$) de acordo com o desenho experimental.

D.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Envolvimento do ácido lisofosfatídico na hemólise induzida pela toxina LiRecDT1.

O eritrócito humano maduro é uma célula bastante simples, ótimo modelo para o estudo dos componentes da membrana plasmática e desempenha uma importante função biológica. A perda do núcleo impede o eritrócito de sintetizar novas proteínas em resposta a estímulos extracelulares, e a falta de um retículo endoplasmático impede o eritrócito de exercer armazenamento intracelular de Ca^{+2} . A ausência de mitocôndrias impede a célula de envolver-se em vias de apoptose, e a perda do Golgi e organelas relacionadas com o tráfico de vesículas impede qualquer remodelação da membrana. Como consequência, o eritrócito adquiriu uma reputação imerecida, possivelmente, como um recipiente biologicamente inativo para a hemoglobina sem funções importantes fora da arena de transporte de gás. Curiosamente, essa reputação tem sobrevivido apesar das evidências abundantes de que essa célula é repleta de componentes de sinalização, tais como proteínas G, canais iônicos, fosfolipases, adenilato e guanilato ciclase, fosfatases, calmodulina e enzimas ativadas por Ca^{+2} e proteínas quinases. O ácido lisofosfatídico (LPA - *Lysophosphatidic acid*) é um derivado da lisofosfatidilcolina que atua como um potente sinalizador molecular. Curiosamente, o impacto da LPA em eritrócitos, as células que constituem aproximadamente 99% da massa de células do sangue, é muito pouco estudado. O objetivo deste trabalho é, portanto, avaliar se a destruição dos eritrócitos humanos pelas toxinas do veneno de aranha marrom é através da produção de LPA e/ou pela ativação de seus receptores. Os dados abaixo demonstram que algumas concentrações de LPA (Gráfico 15) são capazes de promover a morte e rupturas dos eritrócitos humanos, a maior concentração testada 500 μM foi capaz de lisar 100% das células. Como descrito nos materiais e métodos, suspensão de eritrócitos humanos lavados (1×10^8 células), na ausência de soro, foram incubadas com concentrações crescentes (0 à 500 μM) de LPA, por 24 horas a 37°C. O experimento foi realizado em tampão Tris/Sucrose e a atividade hemolítica direta foi observada através da medida da hemoglobina liberada, obtida 550 nm. Os resultados do efeito hemolítico foram expressos em porcentagem, comparando os valores das amostras com o do controle positivo, contendo Triton

0,1%, para o qual atribuiu-se 100% hemólise. Para assegurar que as condições de ensaio estavam adequadas e nenhum outro fator experimental estaria interferindo no efeito hemolítico observado foi realizado, em todos os experimentos um controle negativo onde não deveria ser observada hemólise (eritrócitos incubados somente com tampão).

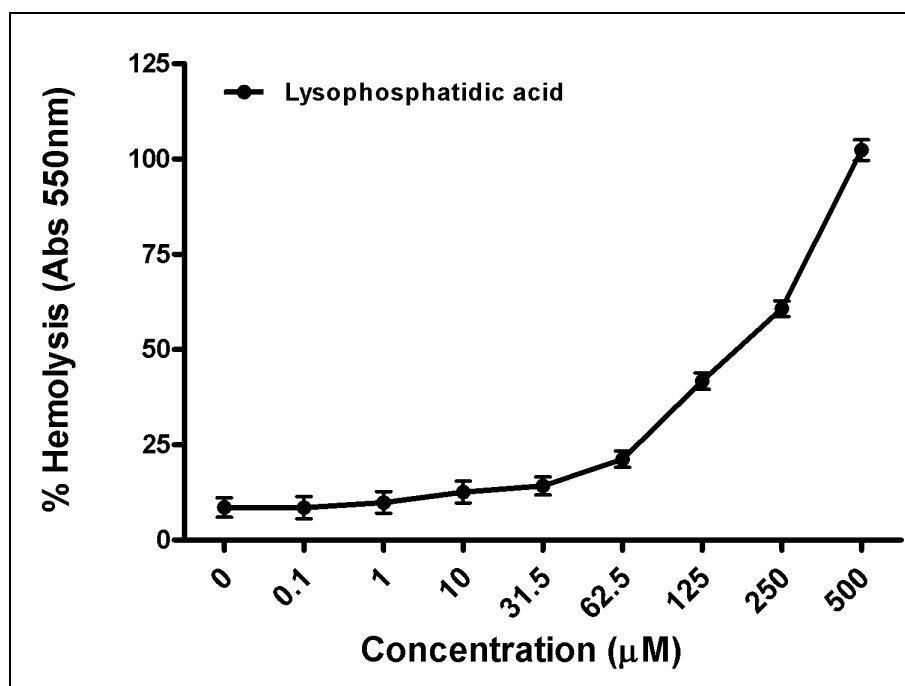


Gráfico 15: Atividade hemolítica do ácido lisofosfatídico. O efeito hemolítico do LPA foi determinado após 24 h e nas concentrações indicadas. O experimento foi realizado em pentaplicata e os pontos representam a média \pm SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como $*P \leq 0,05$.

Já foi mostrado na literatura (Yang, Andrews *et al.*, 2000), que o LPA, um segundo mensageiro lipídico solúvel em água, induz o influxo de Ca^{2+} em eritrócitos humanos. Diversas evidências argumentam que a captação de Ca^{2+} é mediada por uma estrutura bem definida desse íon pelo seu canal ao invés de um vazamento inespecífico. Isso corrobora os nossos dados (B – Item 2) em que foi mostrado que tanto o veneno de *L. intermedia* quantos as fosfolipases-D recombinantes são capazes de promover o influxo de cálcio. Em segundo lugar, o canal de cálcio do Tipo-L foi inibido e aboliu-se a entrada de cálcio descartando dessa forma um vazamento inespecífico através da membrana. O influxo de Ca^{2+} pode induzir a

desidratação dos eritrócitos, externalização de fosfatidilserina, mudanças na estrutura da membrana plasmática e conseqüente morte e ruptura dessas células (Foller *et al.*, 2008).

Por outro lado, uma segunda possibilidade do mecanismo desencadeado pela fosfolipase-D do veneno da aranha marrom, seria através da ativação dos receptores de LPA. Há evidências da presença de pelo menos seis receptores de superfície de alta afinidade por LPA (LPA₁, LPA₂, LPA₃, LPA₄, LPA₅ e LPA₆), descritos em mamíferos, e associados à proteína G (*G protein-coupled receptors* “GPCRs”). Muitos efeitos do LPA se devem ao acoplamento dos seus receptores às proteínas G que, por sua vez, regulam a atividade de outros mensageiros intracelulares (Choi, Herr *et al.*, 2010; Chun, Hla *et al.*, 2010).

Para avaliar a participação dos receptores do LPA no efeito hemolítico do veneno de *L. intermedia* sobre eritrócitos humanos foram realizados experimentos que avaliaram a capacidade de inibição de hemólise “*in vitro*”, utilizando um antagonista específico dos receptores PLA₁/LPA₃ (VPC 32183). Os resultados deste experimento (Gráfico 16) mostram que existiu inibição muito semelhantes tanto para o LPA quanto para a LiRecDT1. A incubação prévia dos eritrócitos com 10 µM de antagonista VPC 32183 por 60 min a 37 °C inibiu 70% do efeito desencadeado por 500 µM de LPA e 50% do efeito de desencadeado por 25 µg/mL da toxina recombinante LiRecDT1.

Estes resultados mostram que o veneno de *L. intermedia* e a fosfolipase-D recombinante possuem atividade hemolítica direta sobre eritrócitos humanos e que nas condições experimentais utilizadas ocorre participação do LPA e dos seus receptores LPA₁/LPA₃ no processo de lise celular. Assim, o LPA gerado pela LiRecDT1 se liga a um receptor acoplado à proteína G, que ativa uma fosfolipase C que, por sua vez gera diacilglicerol e 1,4,5 inositoltrifosfato. Estes segundos mensageiros são, então, capazes de ativar a proteína quinase C e promover a entrada de Ca²⁺ na célula. Embora o influxo de Ca²⁺ possa ser deflagrado diretamente pelo LPA a ativação da quinase C parece estar também implicada nas células vermelhas. Além disso, o efeito hemolítico não foi inibido completamente, o que abre a possibilidade da participação de outras moléculas efetoras geradas pelas fosfolipases-D do veneno de *L. intermedia* e que serão discutidas abaixo.

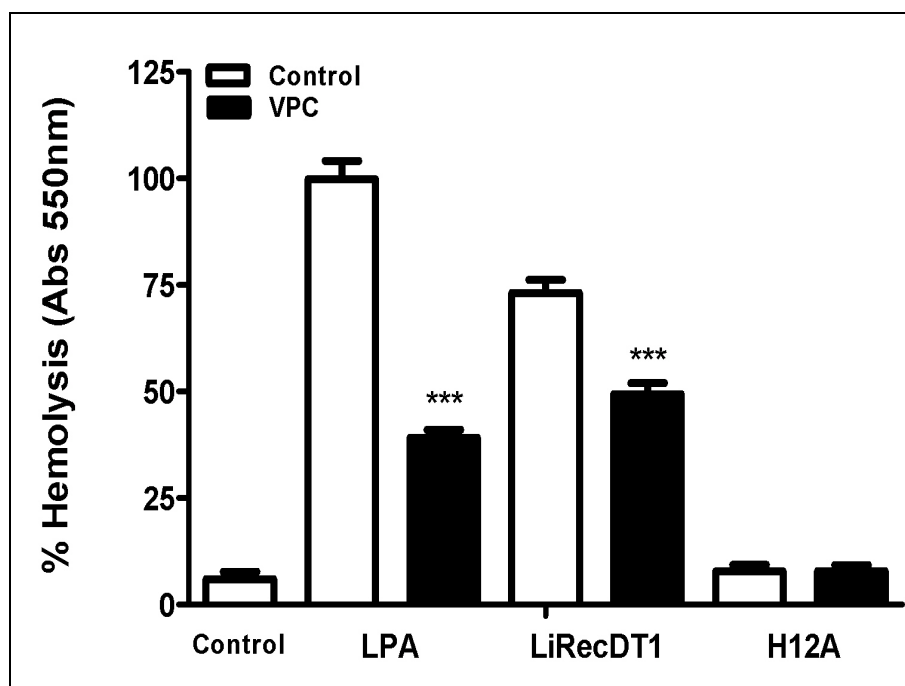


Gráfico 16: Inibição da atividade hemolítica pelo antagonista do receptor LPA1/LPA3. O efeito inibitório do antagonista do receptor LPA1/LPA3 (VPC 32183) * foi determinado após 1h de incubação dos eritrócitos com 10µM de VPC, seguido da incubação com 25µg/mL de toxina ou 500µM de LPA. O experimento foi realizado em pentaplicata e os pontos representam a média ± SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como ***P ≤ 0,001.

*VPC 32183 = (S) phosphoric acid mono 2octadec9enoylamino3 [4(pyridin2ylmethoxy) phenyl] propylester amonium salt.

Envolvimento de componentes da membrana eritrocitária na hemólise induzida pela fosfolipase-D do veneno de *L. intermedia*.

Os “*Lipid raft*” são regiões com distinta composição e característica estrutural e que parecem agir como plataformas para colocalizar proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular. A organização das membranas em microdomínios está longe de ser aleatória, os fosfolípidios podem realmente ser altamente organizados dentro de diferentes partes da membrana, e esta organização pode influenciar o modo que as proteínas da membrana são distribuídas. Esses “*rafts*” são especialmente ricos em esfingolípídios e colesterol, e as cadeias laterais dos fosfolípidios presentes geralmente são altamente enriquecidas em ácidos graxos saturados em comparação com as regiões vizinhas “*nonraft*” da membrana. Como resultado da presença de colesterol e ácidos graxos saturados, os *lipid rafts* são

mais ordenados e menos fluidos do que a membrana que os envolve. Muitas proteínas citoplasmáticas que são covalentemente modificadas por ácidos graxos saturados (*palmitoyl* ou *myristoyl*) e proteínas de superfície celular que estão ligados através de uma âncora de glicosil fosfatidilinositol são altamente concentradas dentro dessas regiões ordenadas. Muitas proteínas envolvidas na transdução de sinal, como quinases da família Src, proteínas G, receptores de fatores de crescimento, MAPK e proteína quinase C são encontrados predominantemente nessas regiões lipídicas, que parecem agir como plataformas de sinalização, trazendo junto (ou seja, colocalizando) vários componentes de sinalização, e assim facilitando sua interação (Calder e Yaqoob, 2007).

Nos eritrócitos os “*lipid rafts*” estão sendo associados à morte celular, reconhecimento e invasão por microorganismos. Nos eritrócitos foi mostrada uma grande concentração de uma proteína heterotrimérica de ligação à guanina (proteína Gsq) implicada em várias cascatas de sinalização nessas células (Kamata, Manno *et al.*, 2008; Koshino e Takakuwa, 2009).

Aqui nessa tese, procurou-se avaliar o envolvimento dessas regiões ordenadas no efeito hemolítico desencadeado pelo veneno de *L. intermedia*. Nossos resultados anteriores mostraram evidências que tanto o veneno bruto quanto a fosfolipase-D recombinante LiRecDT1 são capazes de se ligarem a esfingomielina e colesterol eficientemente (Chaim *et al.*, 2011) e ambos também conseguem promover a agregação desses *lipid rafts* (Chaves-Moreira *et al.*, 2009). Abaixo foi utilizado outro método para avaliar a participação dessas regiões na hemólise induzida pela LiRecDT1. Promoveu-se então a depleção do colesterol para interromper a organização estrutural da membrana eritrocitária. Para tanto, como descrito nos materiais e métodos, uma suspensão de eritrócitos humanos lavados (1×10^8 células), na ausência de soro, foram incubadas com concentrações (0, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM e 10 mM) de metil- β -ciclodextrina (M β CD), por 60 minutos a 37°C (Kilsdonk, Yancey *et al.*, 1995; Yancey, Rodriguez *et al.*, 1996). Após esse período os eritrócitos foram lavados e incubados com 25 μ g/mL da toxina recombinante LiRecDT1 por 24 horas. Como está ilustrado abaixo (Gráfico 17), a depleção e desorganização dos *lipid rafts* promoveram 10 % de inibição da hemólise deflagrada pela LiRecDT1. Esses dados foram reforçados por outro dado obtido. Quando se incubou com diversas concentrações de nistatina (25 μ g/mL, 50 μ g/mL, 75 μ g/mL e 100 μ g/mL) os eritrócitos por 30 minutos à 37 °C, seguida da incubação

com 25 $\mu\text{g/mL}$ da toxina recombinante LiRecDT1 por 24 horas observou-se novamente inibição da hemólise (Gráfico 18). A nistatina se liga fortemente ao colesterol, mas sem extraí-lo e promove a desorganização significativa dos *rafts* (Smith, Sanger *et al.*, 2007). Na sua presença, a hemólise é inibida em 20% nas concentrações acima de 50 $\mu\text{g/mL}$, reforçando a idéia da participação dos *lipid rafts* na hemólise deflagrada pela fosfolipase-D. Esses resultados fornecem também indícios de que ainda haja outras transduções de sinais nos eritrócitos danificados pela toxina recombinante LiRecDT1, já que essa inibição não foi completa.

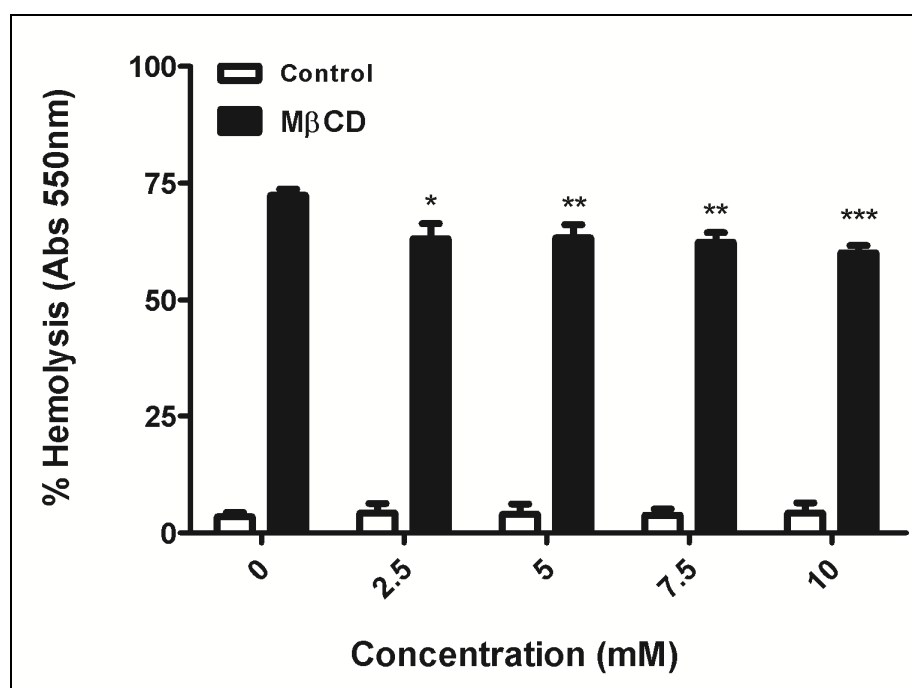


Gráfico 17: Inibição da atividade hemolítica pelo tratamento dos eritrócitos com metil- β -ciclodextrina (M β CD). O efeito inibitório da extração de colesterol pela (M β CD) foi determinado após 1h de incubação dos eritrócitos com 0, 2.5mM, 5mM, 7.5mM e 10mM à 37 °C, seguido da incubação com 25 $\mu\text{g/mL}$ de toxina LiRecDT1. O experimento foi realizado em pentaplicata e os pontos representam a média \pm SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

Os eritrócitos humanos possuem uma carga superficial líquida negativa, e a maior parte desse encargo é devido ao ácido siálico ionizado (Durocher, Payne *et al.*, 1975). O papel do ácido siálico não é claro, mas está localizado no exterior de algumas glicoproteínas (glicoforinas), os antígenos MN e serve como sítios receptores para patógenos. Essa carga negativa sobre os eritrócitos pode também

interagir com as cadeias laterais dos aminoácidos positivos encontrados na superfície das fosfolipases-D do veneno da *L. intermedia*. Esse poderia ser um possível sítio de reconhecimento da célula pela toxina. Para testar essa hipótese foi feito o tratamento destes eritrócitos com sialidase (neuraminidase), que libera mais de 95% do ácido siálico da superfície (Gattegno, Bladier *et al.*, 1974; Aminoff, Bruegge *et al.*, 1977). A neuraminidase especificamente cliva as ligações glicosídicas entre o ácido siálico e mucopolissacarídeos. Esta enzima reduz drasticamente a carga negativa da superfície dos eritrócitos humanos. Porém não altera a composição protéica ou fosfolipídica da membrana, como pode ser visualizado na figura 29.

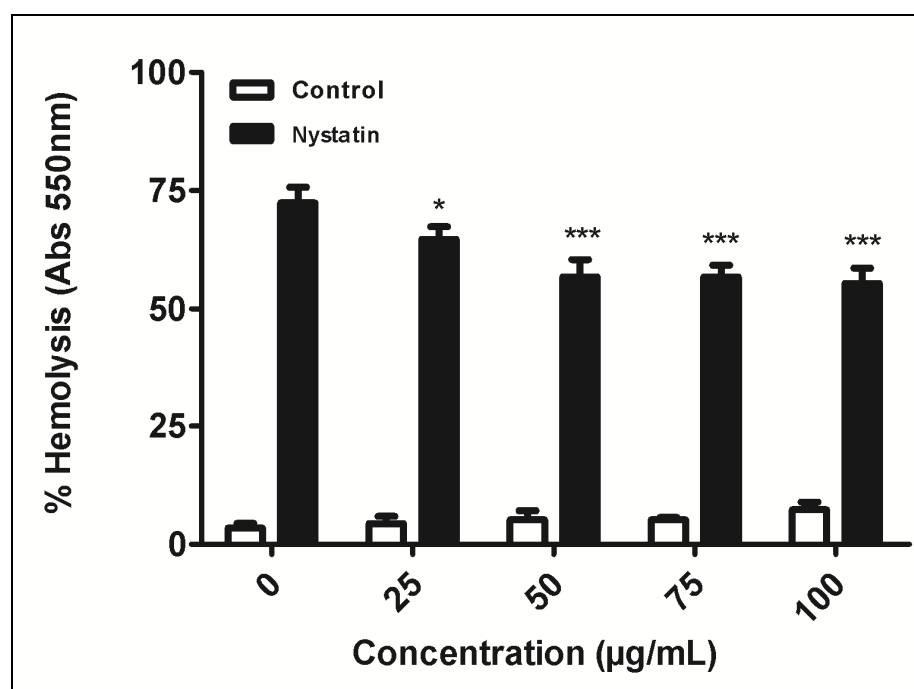


Gráfico 18: Inibição da atividade hemolítica pelo tratamento dos eritrócitos com nistatina.

O efeito inibitório do impedimento estérico de colesterol pela nistatina foi determinado após 30 minutos de incubação dos eritrócitos com 0, 25µg/mL, 50µg/mL, 75µg/mL e 100µg/mL à 37 °C, seguido da incubação com 25µg/mL de toxina LiRecDT1. O experimento foi realizado em pentaplicata e os pontos representam a média ± SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como *P ≤ 0,05; **P ≤ 0,01; ***P ≤ 0,001.

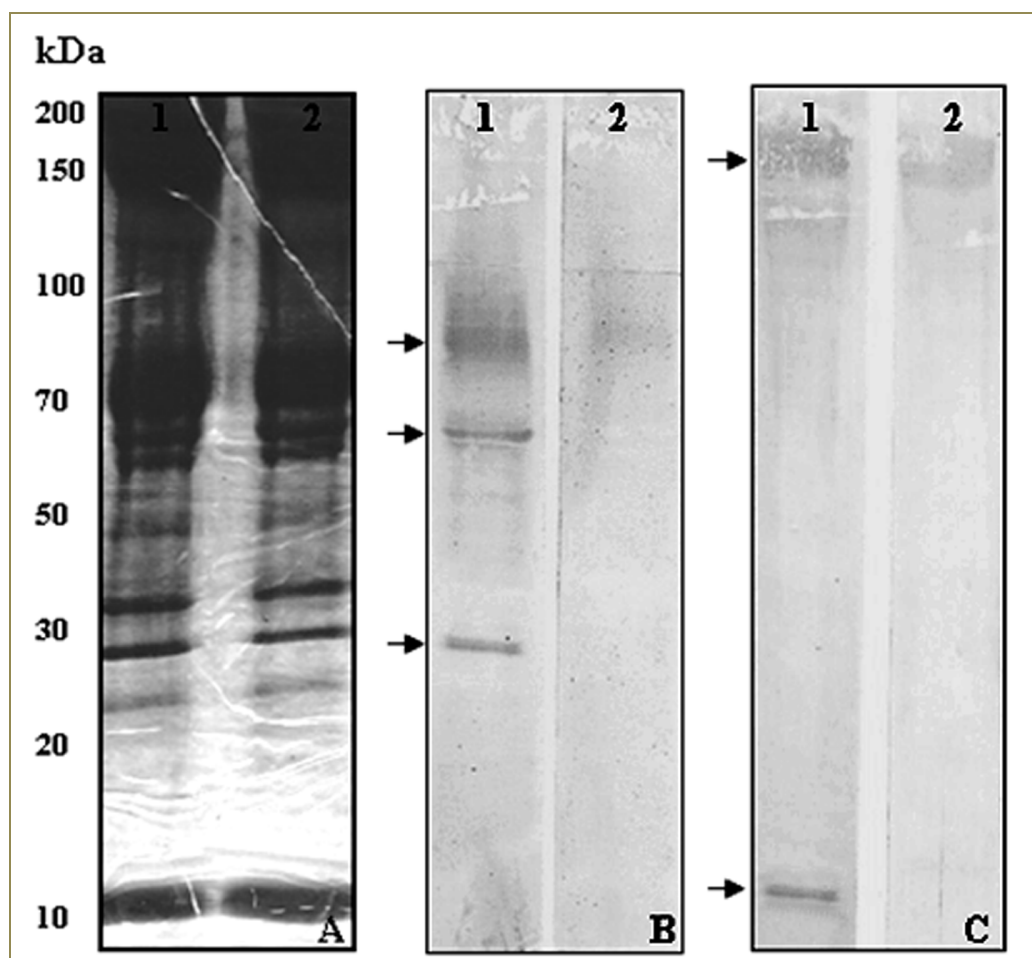


Figura 29: Perfil protéico da membrana eritrocitária humana. (1) Eritrócito humano normal. **(2)** Eritrócitos tratados com 25 mU/ml de Neuroaminidase de *Arthrobacter ureafaciens* por 30 minutos à 37°C. **(A)** SDS-PAGE da membrana eritrocitária corado por Azul de Coomassie, perfil normal. **(B)** Lectinblot revelado a pós a incubação da figura A com MAA (*Aglutinina de Maackia amurensis*), que reconhece especificamente ácido siálico ligado $\alpha(2-3)$ a galactose, flechas indicam glicoforina A, glicoforina B e glicoforina C. **(C)** Imunoblot revelado após a incubação da figura A com 25 μ g/mL de toxina LiRecDT1, seguida de lavagem e posterior incubação com anticorpo policlonal contra a toxina LiRecDT1, flechas indicam possíveis sítios de reconhecimento.

Assim foi verificado que o tratamento dos eritrócitos humanos com 25 mU/ml de Neuroaminidase de *Arthrobacter ureafaciens* por 30 minutos à 37°C remove quase completamente os ácidos siálicos da membrana eritrocitária. Para nos certificarmos de que o tratamento realmente havia retirado os resíduos de ácido siálico da superfície dos eritrócitos realizou-se um *Lectin-Blot*, para isso foi utilizado o DIG Glycan Differentiation Kit (Roche, Germany).

Após a SDS-PAGE do *ghost* de eritrócitos, gel foram transferidos para membranas de nitrocelulose, apoiado por papéis de filtro e as almofadas de cada lado. O *Blotting* foi realizado à 100 V, 350 mA por 2 h com Trans-Blot Transferência eletroforética (Bio-Rad). As membranas foram coradas com Ponceau-S 0,1% (Sigma). A fim de determinar glicoconjugados da superfície celular dos eritrócitos, as membranas foram incubadas com MAA (*Aglutinina de Maackia amurensis*), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as membranas foram bloqueadas com 10% (w/v) tampão de bloqueio (Roche Applied Science) em TBS 0,5% Tween 20, pH 7,5 por 30 min à temperatura ambiente e lavados com TBS (pH 7,5) e buffer 1 para 10 min cada etapa. A lectina MAA foi diluída em tampão 1 (1:200). Posteriormente, as membranas foram incubadas com a lectina por 60 minutos em temperatura ambiente, lavados três vezes com TBS por 10 min, e em seguida incubadas com 1 ml de anti-digoxigenina-AP, em TBS por 60 minutos. Após a lavagem com TBS, a fim de determinar as bandas com ácido siálico ligada à lectinas, as membranas foram reveladas com 20 ml de reagente BCIP/NBT (Roche Applied Science) em tampão 2 até que as bandas se tornam visíveis como itrustrano na figura 29, e a reação foi interrompida com água ultra pura destilada.

Procedeu-se então um ensaio de hemólise como descrito nos materiais e métodos, onde essencialmente esses eritrócitos tratados com sialidase foram expostos a LiRecDT1. O Gráfico 19 ilustra a inibição quase total da hemólise induzida pela toxina nos eritrócitos tratados com a neuraminidase quando comparada com os eritrócitos normais. Isso sugere que a superfície negativa ou a siaglicosilação das proteínas de membrana dos eritrócitos são fundamentais para a ação tóxica dessa fosfolipase-D.

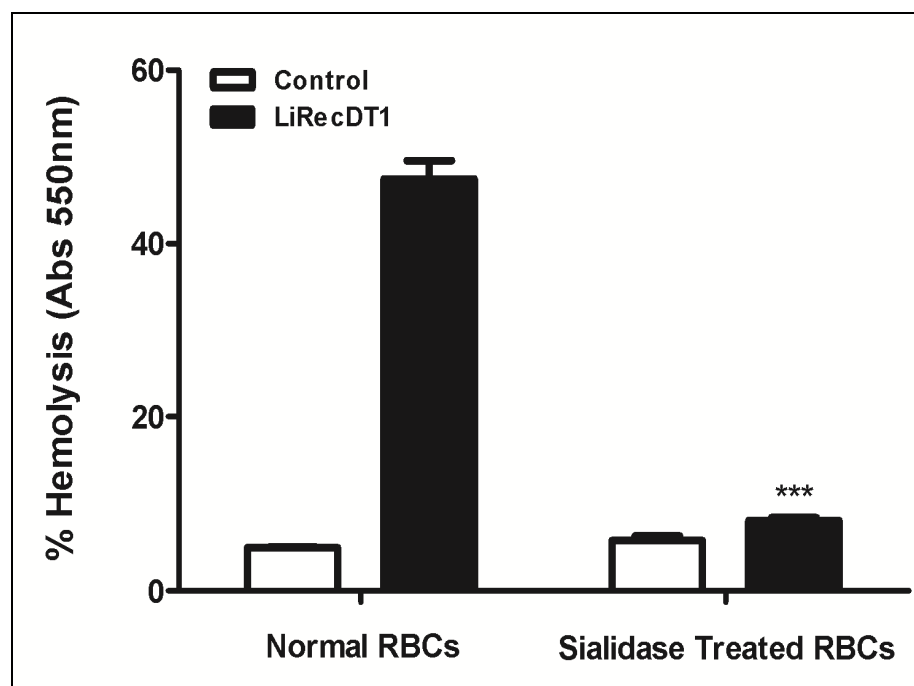


Gráfico 19: Inibição da atividade hemolítica pela remoção dos ácidos siálicos da superfície dos eritrócitos. Os eritrócitos humanos foram tratados com 25 mU/ml de Neuroaminidase de *Arthrobacter ureafaciens* por 30 minutos à 37°C. Após isso, foram lavados e incubados com 25µg/mL de toxina LiRecDT1 por 12 horas à 37 °C. O experimento foi realizado em pentaplicata e os pontos representam a média ± SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como ***P ≤ 0, 001.

Após isso, para comprovar que a atividade catalítica da LiRecDT1 estava sendo menor nas células sem ácido siálico, procedeu-se a obtenção do “ghost” eritrocitário uma vez que a hemoglobina interfere na leitura da fluorescência. Utilizou-se então o “ghost” tratado com sialidase e o “ghost” normal para realização da dosagem da atividade fosfolipásica-D através do método fluorimétrico do Amplex red. Nossos dados mostraram uma inibição de cerca 40% da atividade enzimática na membrana tratada com sialidase (Gráfico 20) em comparação à membrana normal. Isso é justificado pela falta dos ácidos siálicos na superfície dos eritrócitos que seriam um sítio de reconhecimento e ligação. Esse resultado corrobora os dados anteriores que indicam que a toxina LiRecDT1 necessita da carga negativa sobre as células para o reconhecimento ou também da função normal dessas proteínas sialoglicosiladas para desempenhar a sua ação tóxica já que a inibição não foi completa.

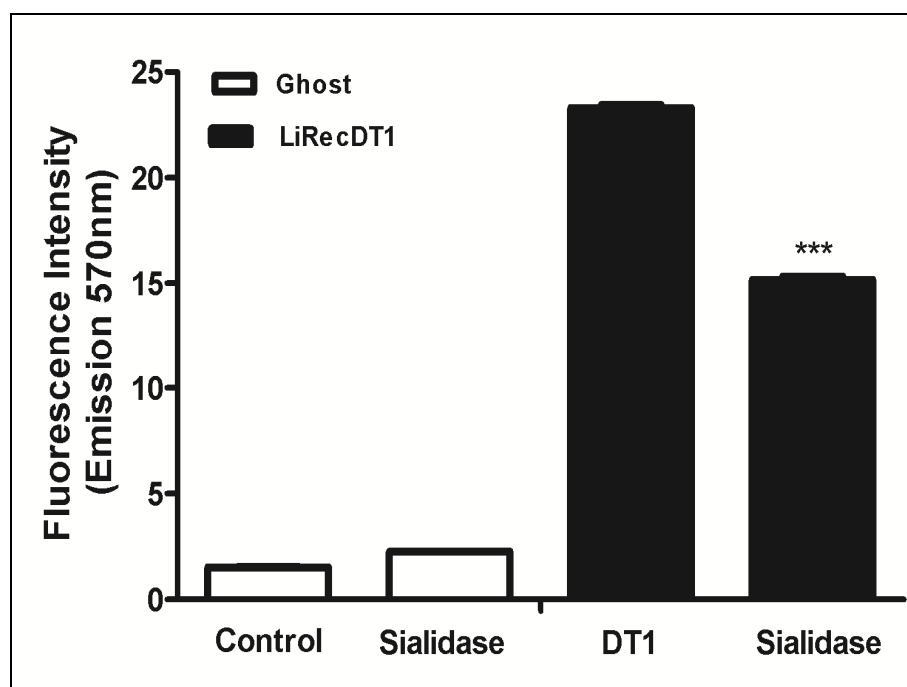


Gráfico 20: Redução da atividade enzimática da LiRecDT1 pela remoção dos ácidos siálicos da superfície dos “ghost” eritrocitário. Os “ghost” dos eritrócitos (normais e tratados com a sialidase) foram obtidos de aproximadamente 5×10^8 células/ml. Os eritrócitos humanos foram lisados e lavados em solução hipoosmótica (NaH_2PO_4 5 mM, PMSF 2 mM e pH 8,0), para retirada da hemoglobina. As células lisadas foram coletadas por centrifugação (12.000xg, 10 min, 4°C), este procedimento foi repetido por várias vezes. As membranas obtidas (100µg) foram utilizadas como substrato para a LiRecDT1 (50µg) em um volume total final de 100 µL por 1 hora a 37 °C e misturada levemente utilizando um shaker rotacional em BOD. Às amostras foi então adicionada uma mistura de reação 100 µL de acordo com o Kit do Amplex red (Molecular Probes) contendo colina oxidase (4U), fosfatase alcalina (80U), peroxidase (20U), e reagente Amplex Red (100 mM), excluindo substrato esfingomielina. Após a incubação em banho-maria por 1 hora a 37 °C, o desenvolvimento de fluorescência foi medido em um fluorímetro Tecan M200 (Tecan, Männedorf, Suíça), utilizando excitação em 540 nm com detecção de emissão a 570 nm. O experimento foi realizado em pentaplicata e os pontos representam a média \pm SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como *** $P \leq 0,001$.

Outra justificativa para a não completa inibição da atividade enzimática seria a perda da glicosilação normal dos receptores GPCR, acoplados à proteína-G inativando-os. Como explicado anteriormente, esses receptores são assim chamados por causa de sua regulação de um complexo heterotrimerico intracelular composto pelas subunidades $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$. A ligação do mensageiro (LPA, S1P ou C1P) ao

receptor estimula a $G\alpha$, a qual encontra-se no ápice de numerosas cascatas de sinalização. Os GPCRs constituem a maior família de proteínas integrais da membrana, possuem sete domínios ou hélices transmembrana, sendo as porções extracelulares muito glicosiladas (Murakami, Ito *et al.*, 2011). Para testar essa hipótese, os mesmo eritrócitos normais e tratados com a sialidase, foram incubados diretamente com um dos possíveis metabólitos (500 μ M de LPA). O resultado obtido reforçou a hipótese de que assim como a membrana havia perdido os resíduos de ácido siálico, algumas proteínas e receptores, como por exemplo, os receptores os LPA_{1-6} (receptores do tipo GPCR), teriam perdido sua glicosilação normal e tornado-se inativo uma vez que houve cerca de 30% de inibição após a exposição ao metabólito (Gráfico 21).

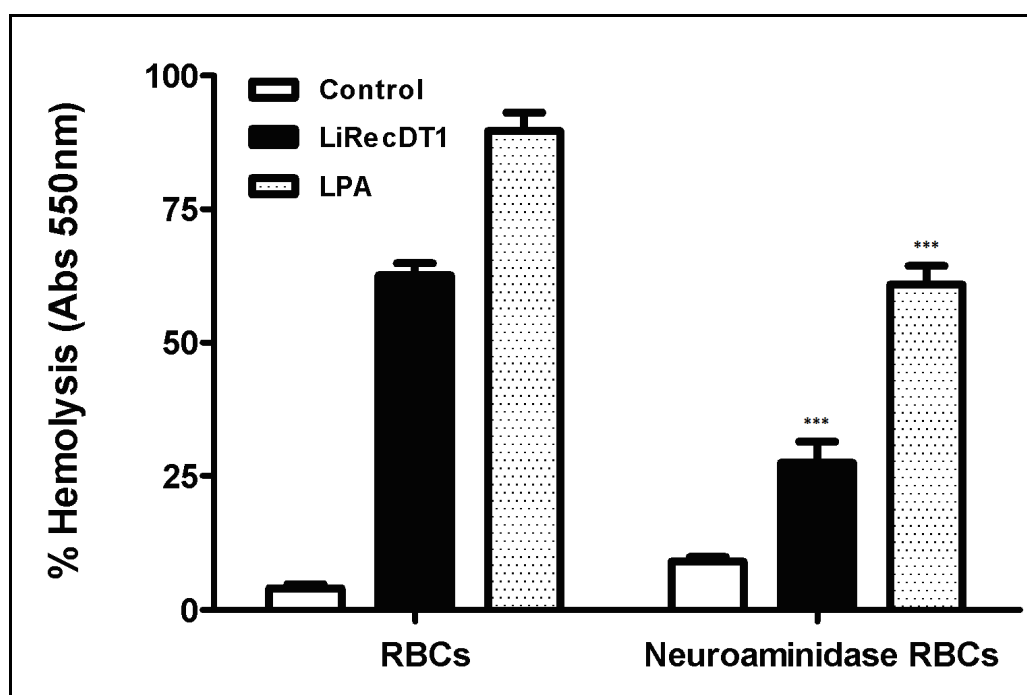


Gráfico 21: Inativação dos receptores GPCR pela remoção dos ácidos siálicos da superfície dos eritrócitos. Os eritrócitos humanos foram tratados com 25 mU/ml de Neuroaminidase de *Arthrobacter ureafaci*s por 30 minutos à 37°C. Após isso, foram lavados e incubados com 25 μ g/mL de toxina LiRecDT1 ou com 500 μ M de LPA por 12 horas à 37 °C. O experimento foi realizado em pentaplicata e os pontos representam a média \pm SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como *** $P \leq 0,001$.

Participação da fosfolipase A₂ e da ciclooxygenase na hemólise induzida pela toxina LiRecDT1.

O principal componente do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* é a enzima com alta atividade de esfingomielinase-D, que rapidamente hidrolisa esfingomielina em ceramida-1-fosfato (C1P). A patologia deflagrada no local da picada consiste em uma intensa resposta inflamatória, acredita-se que mediada por ácido araquidônico (AA) e prostaglandinas (PGE₂). Assim, a produção de C1P pela ação da LiRecDT1 poderia ser correlacionada com ativação da fosfolipase A₂. Recentemente a C1P foi descoberta como um novo membro do grupo crescente de esfingolípídios bioativos, que incluem ceramida, esfingosina e esfingosina-1-fosfato. A C1P é capaz de ligar-se diretamente a PLA₂ e parece ser um forte indutor da mesma, promovendo dessa forma a sua ativação “*in vitro*” e em células. Estudos mostraram que a C1P especificamente interage e ativa a PLA₂ de forma cálcio-dependente em mecanismo que requer a translocação do domínio C2 N-terminal da PLA₂, para a indução da liberação de AA e síntese de eicosanóides (Pettus, Bielawska *et al.*, 2004; Pettus, Chalfant *et al.*, 2004; Pettus, Kitatani *et al.*, 2005; Lamour, Subramanian *et al.*, 2009). Além disso, existem vários indícios que os metabólitos da esfingomielina (ceramida, ceramida-1-fosfato, esfingosina e esfingosina-1-fosfato), possam ser rapidamente interconvertidos intracelularmente por enzimas citoplasmáticas, como a ceramidase, quinases e fosfatases (Chalfant e Spiegel, 2005; Lamour e Chalfant, 2005; Gomez-Munoz, 2006; Boath, Graf *et al.*, 2008; Arana, Gangoiti *et al.*, 2010; Christie e Han, 2010; Bornancin, 2011; Gangoiti, Arana *et al.*, 2011). Dados obtidos anteriormente nos instigaram a avaliar a participação dos eicosanóides no processo hemolítico induzido pela LiRecDT1, uma vez que sabe-se que a prostaglandina desencadeia morte celular e influxo de cálcio. Utilizou-se para confirmar essa hipótese um inibidor da PLA₂ (p-BpB) BpB (Erman, Azuri *et al.*, 1983; Ouyang e Kaminski, 1999) e dois inibidores da ciclooxygenase (ácido acetilsalicílico e diclofenaco) (Lang, Lang *et al.*, 2005; Lang, Kempe, Myssina *et al.*, 2005). Dessa forma, incubou-se uma suspensão de eritrócitos com concentrações crescente desses inibidores (0, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mM) em tampão Tris-sucrose por uma hora à 37°C (Ver material e métodos). Após isso, as células foram lavadas e incubadas com 25 µg/ml de LiRecDT1 por 24 horas. Abaixo se visualiza a participação da PLA₂ e da COX na hemólise induzida pela toxina

recombinante. O Gráfico 22 mostra, que houve uma inibição dose dependente em função do aumento da concentração tanto do p-BpB - inibidor da PLA₂, quanto do ácido acetilsalicílico (AAS) e do diclofenaco - inibidores da COX. Mostrou-se que na maior concentração (1 mM) dos três compostos inibiu-se quase 50% da hemólise induzida pela LiRecDT1. Esses dados evidenciam que a fosfolipase-D pode estar induzindo a morte dos eritrócitos humanos através da ativação da produção dos eicosanóides, tanto pela produção de C1P que induz a ativação direta da PLA₂ que conseqüentemente libera AA para a produção de prostaglandinas e leucotrienos (moléculas efetoras) ou também pela interconversão da C1P à S1P pela ceramidase, que pode ativar diretamente a COX-2 e gerar também prostaglandinas e leucotrienos.

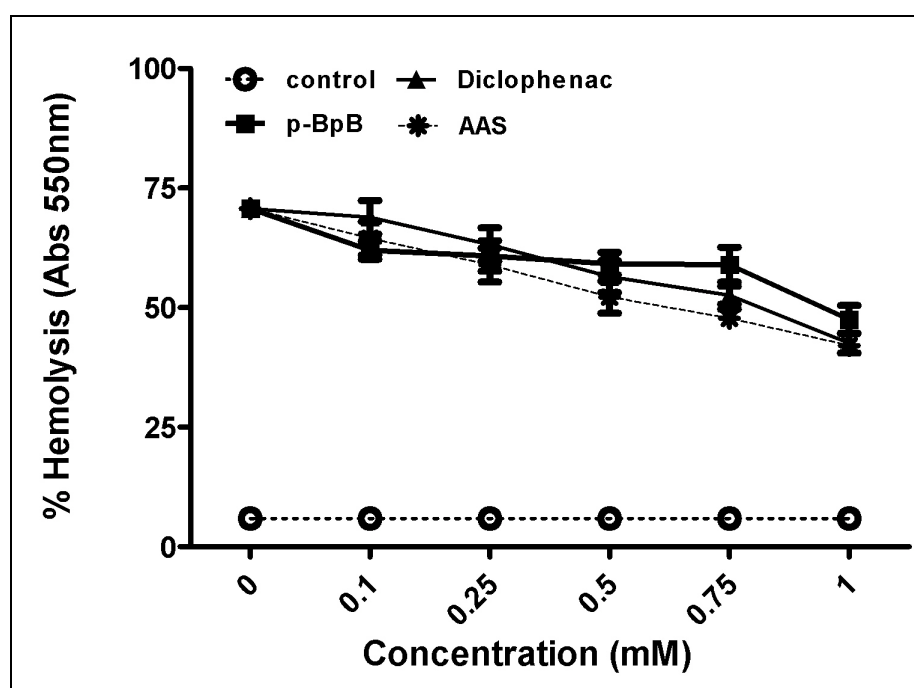


Gráfico 22: Envolvimento da Fosfolipase A₂ e da Ciclooxygenase na hemólise induzida pela LiRecDT1. Os eritrócitos humanos foram tratados com 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 e 1 mM de p-bromofenacil brometo (p-BpB), ácido acetilsalicílico (AAS) e diclofenaco de sódio por 60 minutos à 37°C. Após isso, foram lavados e incubados com 25µg/mL de toxina LiRecDT1 24 horas à 37 °C. O experimento foi realizado em pentaplicata e os pontos representam a média ± SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como ***P ≤ 0,001.

Participação da fosfolipase-C na hemólise induzida pela toxina LiRecDT1.

Como já foi mencionado anteriormente, os esfingolípídeos são componentes essenciais das membranas celulares, e muitos deles regulam funções celulares vitais. Em particular, os metabólitos da esfingomielina desempenham papel crucial nos processos de sinalização celular. Em especial, C1P e S1P podem agir como mensageiros intra e extracelulares (Hanel, Andreani *et al.*, 2007), se ligando e ativando receptores específicos da membrana plasmática que são acoplados a proteínas Gi. A ativação da Gi promove a ativação da fosfolipase-C resultando na hidrólise do fosfatidilinositol (4,5) P2 e a produção de dois mensageiros intracelulares, inositol trifosfato (1,4,5) e diacilglicerol. Essas duas últimas moléculas agem como indutores de várias respostas celulares (Chalfant e Spiegel, 2005; Lamour e Chalfant, 2005; Gomez-Munoz, 2006; Boath, Graf *et al.*, 2008; Arana, Gangoiti *et al.*, 2010; Christie e Han, 2010; Bornancin, 2011; Gangoiti, Arana *et al.*, 2011). Algumas toxinas com atividade fosfolipásica induzem a hemólise dos eritrócitos através da ativação da fosfolipase-C endógena por meio da proteína Gi sensível a toxina pertussis (Ochi, Miyawaki *et al.*, 2002; Ochi, Oda *et al.*, 2003; Oda, Ikari *et al.*, 2006; Oda, Matsuno *et al.*, 2008; Oda, Takahashi *et al.*, 2010). Com esses dados, levantou-se a hipótese de que as fosfolipases-D presentes no veneno de *L. intermedia* pudessem através da ativação do metabolismo da esfingomielina gerar C1P e S1P que extracelularmente podem ativar seus receptores acoplados a proteína Gi e ativar uma PLC endógena e deflagrar na morte e ruptura dos eritrócitos. Para analisar isso, foi incubado 1×10^8 células em Tampão Tris/Sucrose (Sucrose 250 mM, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 280 mOsm/kg H₂O) com várias concentrações (0, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mM) de inibidores de fosfolipase-C por 60 minutos à 37°C. Utilizamos o U73122, que é um amino esteróide e usado como inibidor específico da fosfolipase-C, que recentemente tornou-se uma ferramenta importante para estabelecer a ligação entre a ativação da fosfolipase-C e a sinalização celular por Ca²⁺ (Mogami, Lloyd Mills *et al.*, 1997). Para reforçar essa hipótese, incubamos com um segundo inibidor específico de PLC, a Neomicina, que é um aminoglicosídeo muito utilizado (Muto, Nagao *et al.*, 1997). Após esse período de incubação os eritrócitos foram lavados em Tampão Tris/Sucrose e em seguida foram incubados com 25 µg/mL da toxina dermonecrótica recombinante LiRecDT1 por 24 horas à 37°C.

No gráfico 23 podemos avaliar a curva crescente de concentrações desses inibidores e seu efeito inibitório sobre a hemólise induzida pela LiRecDT1. A inibição da PLC endógena promoveu uma curva de inibição da hemólise bastante acentuada que iniciou com 10% na menor concentração 100 μ M até atingir 70% de inibição na maior concentração testada 1 mM. Esses dados reforçam a idéia da participação de uma PLC endógena na morte e ruptura dos eritrócitos deflagrados pela LiRecDT1. Além disso, uma justificativa adicional que apóia este hipótese é a conhecida mobilização de cálcio através de canais de cálcio dependente de voltagem do Tipo-L ou T que é induzida pela PLC endógena ativada (Unno *et al.*, 2003). Como foi mostrado no Item 1, a toxina recombinante LiRecDT1 promove o influxo de cálcio através do canal do tipo-L que acarreta na hemólise das células. Provavelmente a PLD da aranha marrom, através dos metabólitos gerados esteja ativando essa PLC endógena que amplifica a cascata de sinalização para morte dessas células.

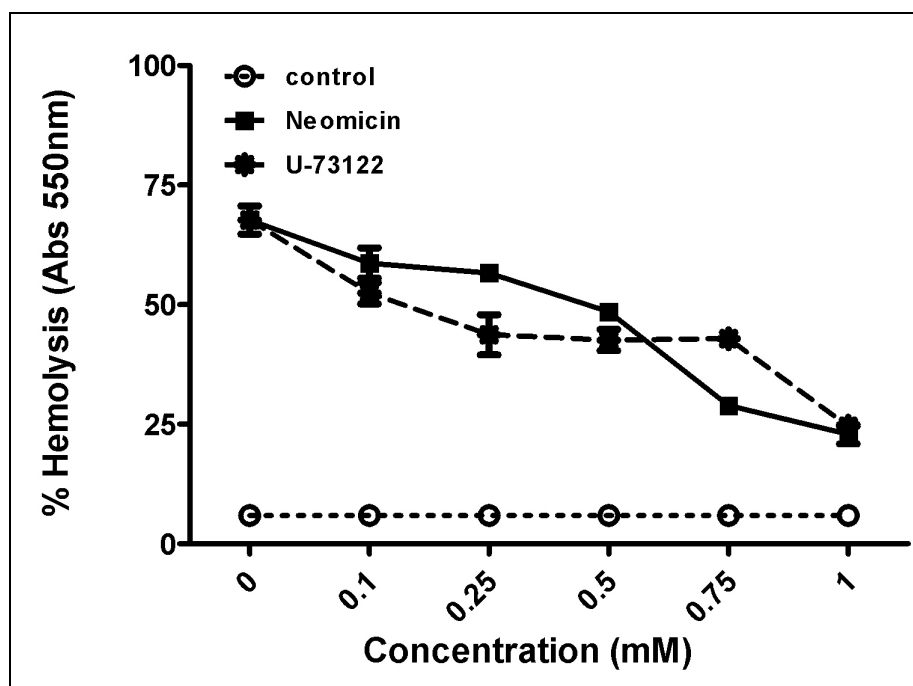


Gráfico 23: Participação da Fosfolipase C endógena na hemólise induzida pela LiRecDT1.

Os eritrócitos humanos foram tratados com 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 e 1 mM Neomicina e U-73122 por 60 minutos à 37°C. Após isso, foram lavados e incubados com 25 μ g/mL de toxina LiRecDT1 24 horas à 37 °C. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos representam a média \pm SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como *** $P \leq 0,001$.

Participação da fosfatase fosfato lipídico na hemólise induzida pela toxina LiRecDT1.

Continuando a investigação do mecanismo pelo qual a fosfolipase-D induz a morte e ruptura dos eritrócitos, outro gatilho chave no metabolismo dos esfingolipídios na transdução de sinal e sobrevivência é a presença de fosfatases fosfato lipídico (PPLs). As LPPs hidrolisam uma variedade de fosfomonoésteres lipídicos, que incluem LPA, PA, S1P e C1P com atividades muito semelhantes (Sigal, Mcdermott *et al.*, 2005; Eyster, 2007a; b). As fosfatases fosfato lipídico (PPLs) são caracterizadas por um domínio contendo seis α -hélices transmembrana conectadas por loops extramembrana, dois dos quais interagem para formar o sítio catalítico. Embora as PPLs possam desfosforilar substratos gerados intracelularmente para controlar o metabolismo de lipídios e conseqüentemente a sinalização intracelular, a sua principal função é na superfície celular principalmente na regulação da sinalização mediada por LPA e S1P pela inativação destes lipídios na membrana plasmática ou no espaço extracelular (Sigal, Mcdermott *et al.*, 2005; Eyster, 2007a; b). Na figura 30 está ilustrada a interconversão dos metabólitos da esfingomielina e a indispensável participação das fosfatases nesse processo.

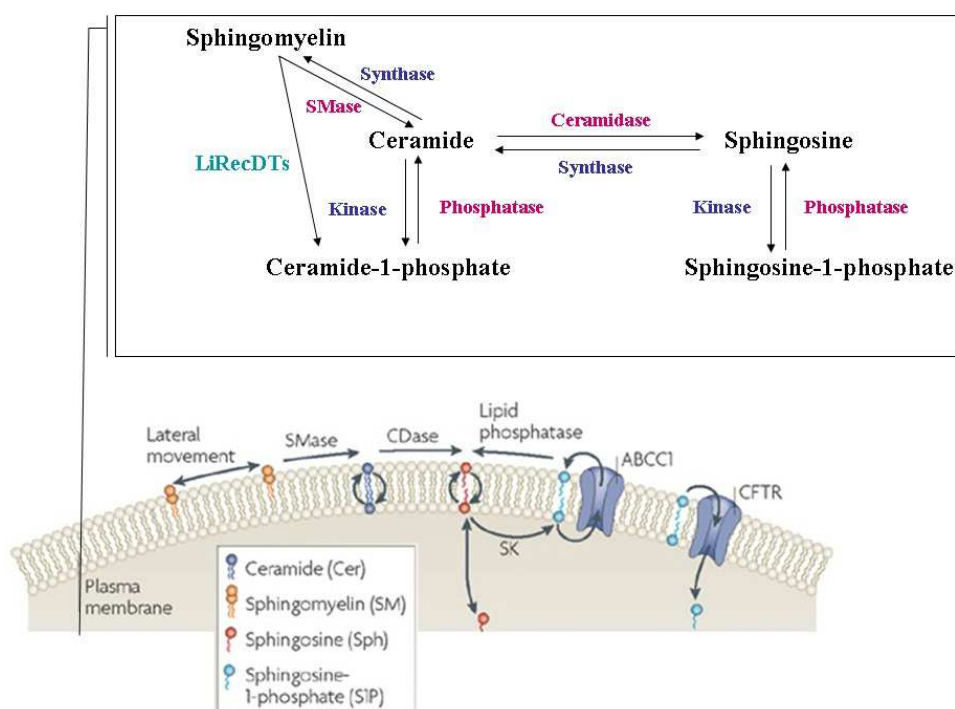


Figura 30: Modelo de membrana plasmática, mostrando o metabolismo da esfingomielina e o mecanismo pelo qual seus metabólitos podem ser transportados através

da membrana. Esfingomielina (SM) tem duas cadeias alifáticas e um grupo cabeça zwitteriônico. Portanto, apenas ocasionalmente faz flip-flops entre as bicamadas e tem solubilidade insignificante em água, mas pode, eventualmente, ter movimentos laterais significativos. Este movimento pode ser dificultado por auto-agregação e/ou interação com os esteróis da membrana. Ceramida (Cer) contém duas cadeias alifáticas, mas tem um grupo cabeça neutro, por isso apresenta solubilidade aquosa menor que a da SM, mas é facilmente capaz de realizar flip-flop entre as membranas. Não se sabe se as interações com outros lipídios ou o particionamento em microdomínios impediriam essa inversão. Esfingosina (Sph) tem uma cadeia alifática (geralmente 18 carbonos de comprimento) e realiza flip-flop livremente e transferência entre as membranas. Esfingosina-1-fosfato (S1P) tem um grupo cabeça zwitteriônico (incluindo um fosfato), e é provável que se mova livremente entre membranas, mas é improvável que realize flip-flop espontaneamente. Assim, dois transportadores ABC têm sido sugeridos para o transporte de S1P: CFTR (regulador transmembrana da fibrose cística) está implicado na entrada de S1P para dentro da célula, e ABCC1 está implicado no efluxo de S1P. CDase, ceramidase; SMase, esfingomielinase, SK, esfingosina cinase e LiRecDTs, toxinas dermonecroticas recombinantes de *Loxosceles intermedia*. Modificado a partir de Hannun e Obeid, 2008.

Sabendo disso tudo, foi incubado 1×10^8 células em Tampão Tris/Sucrose (Sucrose 250 mM, 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 280 mOsm/kg H_2O) com várias concentrações (0, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 mM) de inibidor de fosfatase, pirofosfato (PPI) por 60 minutos à 37°C. Após esse período de incubação os eritrócitos foram lavados em Tampão Tris/Sucrose e em seguida foram incubados com 25 µg/mL da toxina dermonecrotica recombinante LiRecDT1 por 24 horas à 37°C. O pirofosfato demonstrou capacidade de inibição da hemólise induzida pela LiRecDT1, atingindo 60% de inibição na maior concentração utilizada 1mM (Gráfico 24). Esse dado reforça a hipótese de que realmente esteja sendo induzido o metabolismo da esfingomielina pela LiRecDT1 e que a morte e ruptura dos eritrócitos depende da interconversão dos seus metabólitos. A C1P gerada pela LiRecDT1 deve ser desfosforilada para originar a ceramida e essa por sua vez transformada em esfingosina que desempenham funções intracelulares. A esfingosina pode então ser fosforilada originando a S1P que possui funções intra e extracelulares, inclusive hemólise.

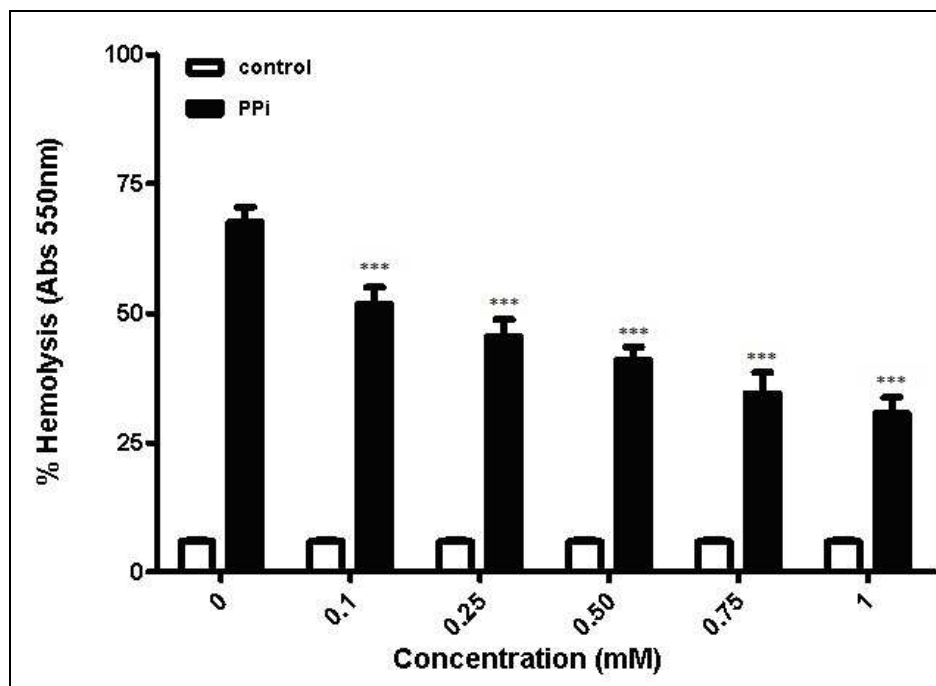


Gráfico 24: Participação de fosfatases intracelulares na hemólise induzida pela LiRecDT1.

Os eritrócitos humanos foram tratados com 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 e 1 mM Pirofosfato (PPI) por 60 minutos à 37°C. Após isso, foram lavados e incubados com 25µg/mL de toxina LiRecDT1 24 horas à 37 °C. O experimento foi realizado em pentaplicata e os pontos representam a média ± SEM, expressos em porcentagem. A significância é definida como ***P ≤ 0,001.

A hemólise induzida pela toxina LiRecDT1 é independente do transportador ligante de ATP.

A S1P é um lipídio bioativo exerce funções intra e extracelulares. Suas respostas extracelulares se dão através de ligação aos seus receptores acoplados a proteína-G (S1P₁ S1P₂ S1P₃ S1P₄ e S1P₅). Tendo como resultados ativação da Rho-GTPases que acarreta na reorganização do citoesqueleto e várias outras vias de sinalização, incluindo mudanças na concentração de Ca²⁺ intracelular, a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase, Akt, MAPKs, Rac1 e PKC. Os níveis celulares de S1P são regulados pela sua síntese e catabolismo. Esfingosina quinases (SK) catalisam a fosforilação da esfingosina (Sph), enquanto S1P é degradada por fosfatases fosfato lipídico. A disponibilidade de Sph é a etapa limitante na geração intracelular de S1P. Sendo a Sph derivada quase que exclusivamente da ceramida através da ação de ceramidases (Kobayashi, Yamaguchi *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostram que a S1P também pode ser gerada no plasma através da atividade da lysophospholipase D / autotaxin. Ainda sabe-se muito pouco sobre o papel intracelular da S1P na modulação de respostas celulares. Recentemente, Oda e colaboradores (2008 e 2010) mostraram elegantemente o papel chave da S1P na hemólise induzida pela α -toxina de *Clostridium perfringens*. Os dados obtidos nesses estudos indicam um aumento na concentração de S1P após a exposição à α -toxina que acarreta na morte e ruptura dos eritrócitos. Além disso, foi mostrado também que esse efeito é revertido pelo tratamento das células com toxina pertussis (inibidor da proteína-Gi), assim como pelo U73122 (inibidor de PLC).

Existem algumas substâncias capazes de bloquear e impedir o transporte de S1P através dessas proteínas ABC. Um exemplo bem conhecido disso é o Vanadato de sódio, que é um análogo do fosfato, que inibe um grande número de ATPases e com grande eficiência sobre o transporte de S1P (Kobayashi, Yamaguchi *et al.*, 2009). Com base em todas essas informações e com o acúmulo de resultados foi avaliada a importância do transporte da S1P para o meio extracelular na hemólise induzida pela LiRecDT1. É de conhecimento que a S1P gerada poderia ser exposta para fora da célula por um transportador ligante de ATP (Família ABC) e dessa forma agir de maneira autócrina ou parácrina (Berdyshev, Gorshkova *et al.*, 2011; Siow, Anderson *et al.*, 2011).

Para avaliar a participação do transportador de S1P incubamos os eritrócitos, com várias concentrações de Vanadato de sódio (Na_3VO_4) que inibe transportadores ABC de exportação de derivados lipídicos. Nas condições testadas não houve qualquer inibição da hemólise induzida por 25 $\mu\text{g/mL}$ de toxina LiRecDT1 em 24 horas (gráfico não mostrado). Nem mesmo nas maiores concentrações 0,75mM e 1mM de Vanadato não houve inibição significativa. Em resumo, esse resultado fornece duas evidências sobre a participação da S1P no mecanismo hemolítico desencadeado pela LiRecDT1. Primeiro, nas condições testadas a S1P não exerce ação extracelular (parácrina ou autócrina) nos eritrócitos incubados com a toxina recombinante uma vez que a inibição de sua exportação não alterou o efeito tóxico. Segundo, é possível que a S1P não tenha participação no evento hemolítico desencadeado pela LiRecDT1, ficando a cargo apenas da C1P e Ceramida e LPA, como indicam nossos resultados anteriores. Ou a S1P apresenta apenas atividade intracelular (mensageiro intracelular) no processo de morte e ruptura das células

vermelhas na presença da PLD recombinante. Porém para isso, são necessários estudos adicionais e mais aprofundados para testar essas hipóteses, principalmente pela detecção da concentração desses metabólitos e pela utilização de outros inibidores dessas vias, que no presente momento não se teve acesso.

A atividade da translocase de membrana (*Scramblase*) não é necessária para o efeito hemolítico induzido pela LiRecDT1.

Vários tipos de injúria eritrocitária estimulam a ativação da PLA₂, que acarreta na liberação de AA e na formação de prostaglandina-E₂ através da ativação da ciclooxigenase (COX) do eritrócito. A PGE₂ por sua vez promove a ativação do canal permeável ao Ca²⁺ (Lang, Kaiser *et al.*, 2003; Lang, Lang *et al.*, 2005; Lang, Kempe, Myssina *et al.*, 2005; Foller, Huber *et al.*, 2008). O aumento da concentração de Ca²⁺ no citosol ativa os canais de K⁺ sensíveis a Ca²⁺, chamados canais de Gardos, levando a hiperpolarização dessas células e subsequente perda de KCl e redução do volume do eritrócito. A *scramblase*, que é a enzima responsável pela externalização de fosfatidilserina (“Flipase” de “Flip Flop”) é estimulada não somente pelos efeitos do Ca²⁺, mas também pela formação de ceramida por ação da esfingomielinase. A entrada de Ca²⁺ ou a formação de ceramida são capazes de ativar a *scramblase* promovendo a externalização de fosfatidilserina da face interna da membrana para a externa da membrana (Mogami, Lloyd Mills *et al.*, 1997; Lang, Kaiser *et al.*, 2003; Lang, Lang *et al.*, 2005; Lang, Kempe, Myssina *et al.*, 2005; Lang, Kempe, Tanneur *et al.*, 2005; Lang, Huober *et al.*, 2006; Foller, Huber *et al.*, 2008; Foller, Sopjani *et al.*, 2009).

A fosfatidilserina na superfície do eritrócito é reconhecida por macrófagos, por meio de receptores específicos e são retiradas da circulação por fagocitose e/ou pode promover a ativação da via clássica do complemento, que induz a formação do complexo de ataque à membrana culminado na hemólise complemento dependente (Tambourgi, Morgan *et al.*, 2000; Tambourgi, De Sousa Da Silva *et al.*, 2002; Tambourgi, Pedrosa *et al.*, 2007; Tambourgi, Goncalves-De-Andrade *et al.*, 2010). Esse é um mecanismo para evitar a ruptura de eritrócitos e a consequente liberação de hemoglobina, a qual, ao passar pelo glomérulo renal precipita nos túbulos e causa obliteração dos mesmos, resultando em falência renal. Alguns aspectos de

morte por apoptose de células nucleadas como, redução de volume, exovesiculação de membrana e exposição de fosfatidilserina também ocorrem nos eritrócitos, devido a isso alguns autores referem-se a esse mecanismo como “*Eriptose*” (Lang, Kaiser *et al.*, 2003; Lang, Lang *et al.*, 2005; Lang, Kempe, Myssina *et al.*, 2005; Lang, Kempe, Tanneur *et al.*, 2005; Foller, Huber *et al.*, 2008) que seria a via de sinalização para morte e retirada dos eritrócitos senis ou danificados de circulação.

Os resultados dessa tese deixam claro que a fosfolipase-D recombinante do veneno de aranha-marrom (LiRecDT1), induz a eriptose dos eritrócitos humanos, uma vez que foi mostrada a capacidade desta toxina em gerar metabólitos da esfingomielina, promover o influxo de cálcio, em alterar a morfologia e o tamanho dos eritrócitos e deflagrar a externalização de fosfatidilserina. Embora, aparentemente não seja possível impedir o processo hemolítico induzido pela LiRecDT1, após o processo de morte ter sido desencadeado através da inibição da externalização de PS. Essa hipótese foi levantada, quando promoveu-se a incubação dos eritrócitos com um inibidor de translocase “*scramblase*”, o laranja de acridina, e subsequente incubação com 25 µg/ml de LiRecDT1 como descrito nos materiais e métodos. Em todas as concentrações testadas de laranja de acridina não observou-se inibição significativa da hemólise (gráfico não mostrado).

Para finalizar este capítulo da tese elaborou-se um esquema ilustrado com o possível mecanismo pelo qual a fosfolipase-D do veneno de *Loxosceles intermedia* desencadeia a morte e a ruptura dos eritrócitos humanos. A Figura 31 sumariza os principais resultados obtidos, em que foi mostrada a participação dos metabólitos de fosfolípidios gerados pela atividade catalítica da LiRecDT1, pela entrada de cálcio nas células, pela ativação de cascatas intracelulares pró-inflamatórias que deflagram os vários efeitos observados nos eritrócitos como a alteração da morfologia e do tamanho dessas células, a injúria, o processo de eriptose e o efeito hemolítico.

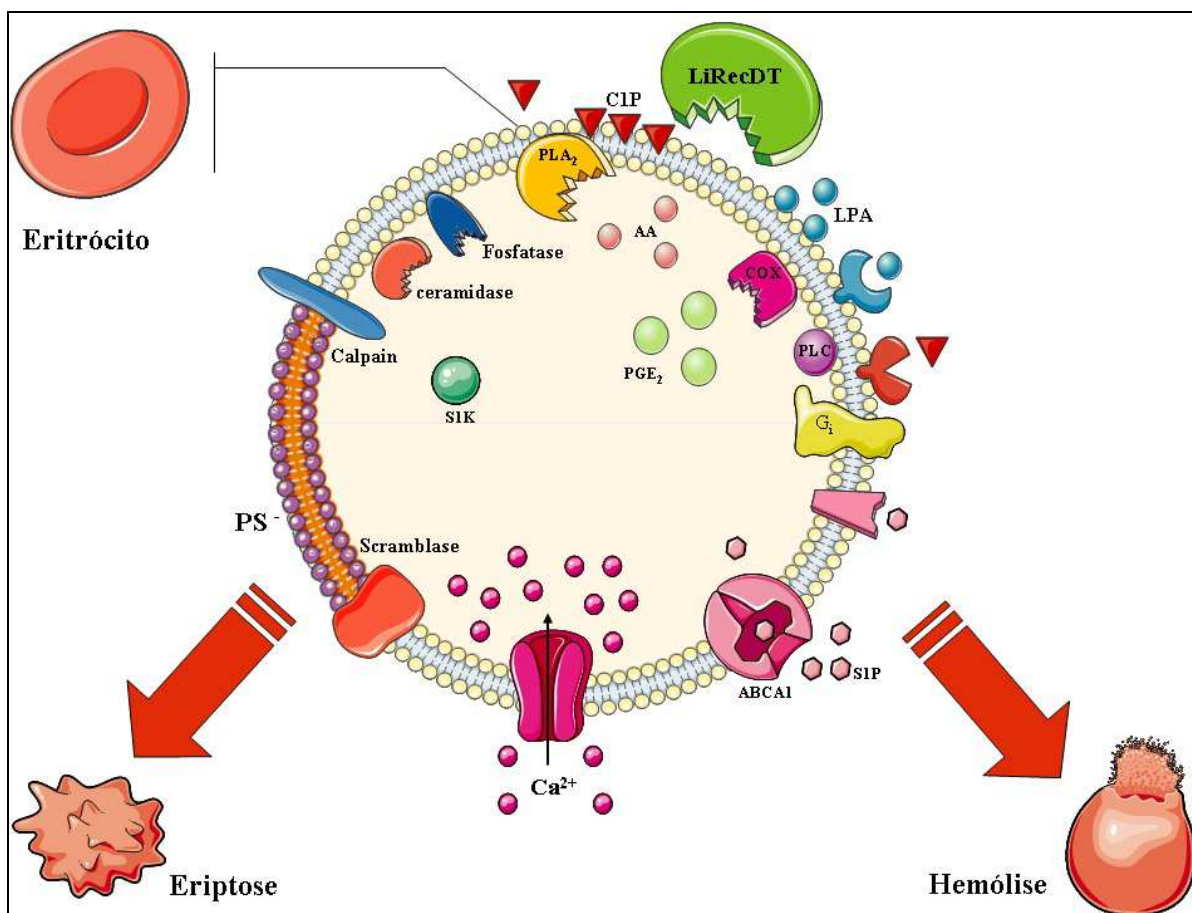


Figura 31: Ilustração esquemática do possível mecanismo molecular, pelo qual a LiRecDT1 desencadeia a morte dos eritrócitos. A partir da ligação da toxina fosfolipase-D do veneno de *Loxosceles intermedia* (LiRecDT) sobre a membrana plasmática, promove a hidrólise de esfingomielina (SM) gerando ceramida-1-fosfato (C1P) que por sua vez é capaz de ligar-se a receptor acoplado a proteína G_i , assim como promover a ativação direta da Fosfolipase A_2 (PLA₂) interna ao eritrócito. Dessa forma existe a liberação de ácido aracdônico (AA) que será metabolizado pela ciclooxigenase (COX) para a formação de mediadores eicosanóides como as prostaglandinas (PGE₂). A Prostaglandina E₂ é um conhecido mediador pró-inflamatório que promove a ativação de diversas enzimas citoplasmática e abertura de canais de cálcio. Por outro lado, a C1P formada a partir da hidrólise de SM pode ser metabolizada a ceramida pela atividade de uma fosfatase e transformada em esfingosina pela ceramidase, que por sua vez será convertida em esfingosina-1-fosfato (S1P) pela esfingosina-1-quinase (S1K). Esses metabólitos lipídicos são conhecidos efetores de inflamação e morte celular. A ceramida e o cálcio ativam a *scramblase* que promove a externalização de fosfatidilserina (PS) e a *calpain* que promove a degradação do citoesqueleto. Juntos desencadeiam o processo de eritose, ou seja, alterações morfológicas e morte prematura dos eritrócitos. Podendo ser reconhecidas por fatores do complemento e retiradas de circulação pelos macrófagos. Por fim, a toxina LiRecDT1 pode também hidrolisar a lisofosfatidilcolina (LPC) para gerar o ácido lisofosfatídico que também possui receptor específico acoplado a proteína G_i que após ativada promove a estimulação da PLC que induzira várias respostas intracelulares, como a abertura de canais de cálcio. Toda essa cascata de sinalização desencadeada culmina na ruptura dos eritrócitos.

E - Item 5: Nova fosfolipase A_2 de *Lonomia obliqua*: Clonagem, Expressão heteróloga e Caracterização funcional.

Daniele Chaves-Moreira, Luiza Helena Gremski, Larissa Vuitika, André Fully, Andrea Senff-Ribeiro, Olga Meiri Chaim, Silvio Sanches Veiga.

Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

No extrato bruto das cerdas das lagartas do gênero *Lonomia*, estão presentes diversas toxinas, incluindo fosfolipases- A_2 , que são responsáveis por muitos efeitos locais e sistêmicos observados nos acidentes. Neste estudo, descrevemos a clonagem e análise de uma sequência que codifica para uma nova isoforma de fosfolipase- A_2 , denominada LoRecPLA $_2$, da lagarta *Lonomia obliqua*. A sequência da LoRecPLA $_2$ codifica para uma proteína recombinante com massa molecular predita de 18.4 kDa, apresentando peptídeo sinal para secreção, um possível sítio de N-glicosilação, e é possível que tenha atividade hidrolítica sobre fosfatidilcolina e atividade hemolítica sobre eritrócitos humanos. Esta toxina é similar a outras fosfolipases presentes em venenos de abelha, vespa, escorpiões e carrapato. Também conserva o sítio de ligação ao íon cálcio e os aminoácidos que formam a fenda catalítica. A obtenção desta fosfolipase A_2 da lagarta *Lonomia obliqua* como proteína recombinante, pode auxiliar no melhor entendimento do quadro patológico observado nos acidentados como também pode possibilitar a aplicação dela em fins biotecnológicos e industriais.

E.1 MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

Reagentes

Os sais, ácidos e compostos orgânicos utilizados foram adquiridos da Merck (Darmstad, Alemanha). O ágar-ágar, β -mercaptoetanol, marcadores de massa molecular protéicos foram adquiridos da Sigma (St. Louis, EUA). Da Promega (Madison, EUA) o brometo de etídio, o kit de miniprep e o kit pGEM-T foram adquiridos. A agarose, o IPTG e o Trizol, da Invitrogen (Carlsbad, EUA). Da empresa Fermentas (Burlington, Canadá) foram adquiridos os marcadores de massa molecular de DNA, X-Gal, enzimas *Pfu* e *Taq* polimerase, ligase, enzimas de restrição *XhoI*, *NdeI* e *BamHI* juntamente com os tampões necessários, além dos dNTPs, a enzima *CIAP* com o correspondente tampão. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de *PCR* foram produzidos sob encomenda pela Bioneer (Daejeon, Coréia do Sul). Para o cultivo de bactérias foram utilizados no preparo dos meios triptona, extrato de levedura e ágar-ágar adquiridos da HiMedia (Mumbai, Índia). Os antibióticos ampicilina e cloranfenicol foram adquiridos da USB (Cleveland, EUA). As cepas bacterianas utilizadas durante o trabalho foram adquiridas das empresas Invitrogen (Carlsbad, EUA) e Novagen (Darmstadt, Alemanha). Da Invitrogen também foi adquirido o kit para as transcrições reversas ImPromITMReverse *Transcription System*.

Animais

Foram utilizadas larvas de sexto instar de *Lonomia obliqua* fornecidas pelo Centro de Zoonoses da Secretária do Estado da Saúde do Paraná bem como coletadas no Zoológico do Parque Iguaçu na cidade de Curitiba.

MÉTODOS

Extração das cerdas

Para a extração das cerdas que revestem o corpo do animal, este foi previamente anestesiado com clorofórmio para que permanecesse imóvel durante a extração. As cerdas foram retiradas uma a uma com o auxílio de pinça e tesoura de ponta fina. Todo o material de segurança necessário para a extração foi utilizado, tais como máscara, óculos de segurança e luvas.

Eletroforese em gel de agarose

As análises dos produtos de *PCRs* foram realizadas em gel de agarose 1,5% ou 2%, na qual a massa correspondente de agarose foi dissolvida em tampão TAE sob aquecimento, sem levantar fervura. Foi adicionado 0,5µg/ml de gel de brometo de etídio à solução.

Extração do RNA total das cerdas produtoras de veneno de *Lonomia obliqua*

O método utilizado foi o descrito por Chomezynski (1993). Foi extraído o RNA total das cerdas de 50 lagartas *Lonomia obliqua* com auxílio do reagente Trizol e todo o material e demais reagentes livres de RNAses. Utilizando isopropanol o RNA foi precipitado, sendo posteriormente lavados com isopropanol 75% e redissolvido com água DEPC tratada (água ultrapura homogeneizada com 0,1% DEPC por 2h e autoclavada por 45 minutos).

Quantificação e análise da integridade do RNA total extraído

Para saber a concentração do RNA extraído e a relação de ácido nucléico em relação à proteínas foi realizada a leitura nos comprimentos de onda 260nm e 280nm em espectrofotômetro (U-2001 Espectrophotometer). Para tal, foram utilizadas cubetas de quartzo tratadas por 15 minutos com solução metanol: ácido clorídrico (1:1). Alternativamente a dosagem foi realizada utilizando 1 µL do RNA total em Nanodrop1000 (*ThermoScientific*). Para saber a integridade do RNA

extraído, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio (0,5µg/ml) em tampão TAE (Tris base 40mM, acetato 20mM, EDTA 1mM) e corrida eletroforética a 5V/cm de gel em cuba horizontal (com prévio tratamento de solução peróxido de hidrogênio 3% por 15 minutos). O gel foi visualizado e a imagem foi registrada com auxílio de aparelho de análise de imagens Chemidoc–XRS e *software* Quantity One-SW (BioRad).

Transcrição reversa acoplada à reação de cadeia da polimerase – 3' RACE

A técnica utilizada foi modificada de Sambrook e Russel (2001). Para síntese da primeira fita de cDNA, foi utilizado o oligonucleotídeo *oligo(dT)17adaptor* (5'-CGG TAC CAT GGA TCC TCG AGT T16- 3'). De maneira resumida, em um tubo PCR foi adicionado o volume equivalente a 1 µg de RNA total, 0,2µM de *oligo(dT)17adaptor* e água DEPC tratada qsp 10µl. Foi feita a desnaturação do RNA colocando este tubo por 5 minutos a 70°C e depois imediatamente no gelo. Neste foram adicionados tampão para transcriptase reversa (1X); MgCl₂ (2,5mM); dNTPs (A,T,C,G - 0,4 mM) e inibidor de RNase (20U Recombinant RNasin). A solução foi homogenizada por pipetagem e incubada por 1 minuto a 42°C. Acrescentou em seguida 200U de enzima transcriptase reversa *Improm-IITM* e a mistura foi levada ao termociclador *My Cycler-Thermal Cycler BioRad* por 25°C/5min e 60min a 42°C. A reação foi interrompida a 70°C/15min e mantida a 4°C. O cDNA foi seletivamente precipitado com acetato de amônio (2,5M) e etanol absoluto gelado (3v:1v de amostra). A mistura foi incubada a -20°C por meia hora. A centrifugação foi realizada a 4°C 20.000g por 30 min. Depois de retirado o sobrenadante, o sedimento foi lavado com 750 µl de etanol 70% gelado apenas dispensado sobre o sedimento. A centrifugação foi realizada na mesma rotação anterior por 5 minutos. Este *pellet* foi ressuspenso em água ultrapura estéril.

Foram então feitas duas reações para amplificação de fragmentos específicos de PLA₂ de *L. obliqua*, cada uma utilizando um oligonucleotídeo sense específico: “PLA₂ Lonomia Sense” (5' ATG TTG AAA TTA ACT GTA GGT GC 3') e “3' RACE PLA₂ Lonomia” (5' AGG AAC AAA ATG GTG CGG TTC 3'). Os dois oligonucleotídeos específicos foram desenhados com base na sequência AY829845.1 (*Lonomia obliqua phospholipase 1 putative phospholipase A₂ mRNA, complete cds*) depositada no banco de dados GenBank como parte da análise do

transcriptoma de *L. obliqua* (Veiga *et al.*, 2005). Para a reação de *PCR*, utilizou-se 5 µl do cDNA obtido na reação anterior; tampão para *Taq* DNA polimerase (1X); $MgCl_2$ (1,5 mM); dNTPs mix (0,2 mM); oligo(dT)17adaptor (0,2 µM); os oligonucleotídeos gene-específicos sense citados acima – reações separadas (0,2 µM); *Taq* DNA polimerase (1,25 U) para um volume final de reação de 50 µl. Esta mistura foi incubada em termociclador: 94°C/2min (1 ciclo); 94°C/30s, 50°C/30s, 72°C/1min (35 ciclos); 72°C/10min (1 ciclo); 4°C/ infinito.

Extração dos fragmentos do gel de agarose

O gel de agarose foi recortado com auxílio de bisturi no local de visualização das bandas correspondentes, colocado em eppendorfs previamente pesados e extraído com auxílio de reagentes apropriados para extração de DNA em agarose (*Quick Gel Extraction Kit*, *Eppendorf* e *Gel Band Purification kit*, *GE*).

Ligação em pGEM-T

O DNA amplificado foi diluído em água, dosado e o volume correspondente a 0,075 pmol deste inserto foi colocado em tubo *PCR*. Adicionado 50ng do vetor pGEM-T (vetor A-T), tampão ligase (1X) e T4 DNA ligase (3 U/µl). A temperatura de incubação foi padronizada para cada caso, variando de 4-16°C por 16h.

Transformação bacteriana por eletroporação

Uma alíquota de solução de bactéria DH5α eletrocompetente foi descongelada e mantida em gelo adicionando 1 µl da reação de ligação e eletroporando-a sob condições de 1.8 kV, 25 MF, 200% em eletroporador *Gene Pulser X-Cell* (BioRad). Estas bactérias foram colocadas em meio SOC (triptona 20 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 0,5 g/l; KCl 2,5 mM; $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glicose 0,2 M) a 37°C por 60 minutos sob agitação para adquirir resistência ao antibiótico específico e recuperarem suas membranas da alta voltagem.

Plaqueamento das bactérias transformadas

As bactérias recuperadas foram divididas em duas porções: uma de 100 µl plaqueadas em meio LB-ágar (triptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l, cloreto de sódio 10 g/l, agar-ágar 15 g/l) suplementado com ampicilina (100 µg/ml) previamente tratadas com *IPTG* (100 mM – 100 µl) e *X-Gal* (20 mg/ml – 40 µl); e outra de 900 µl (também plaqueada nas mesmas condições) que foi submetida a centrifugação e ressuspensão em 100 µl de meio SOC para o plaqueamento. As placas com a suspensão bacteriana foram semeadas com alça de drigalski estéril até completa absorção do líquido na placa. As placas foram incubadas a 37°C em incubador tipo BOD 411 D, Nova Ética por 16 h.

PCR de colônia

Após observação das placas anteriormente citadas, foram escolhidas colônias incolores (supostamente com inserto), algumas azuis e outras parcialmente azuis para replaqueamento (*Master plate*) e confecção do *PCR* de colônia. Cada uma das colônias escolhidas foi tocada com auxílio de palito de madeira estéril, parte do material esfregado no fundo de um tubo de 0,2 ml e outra parte tocada na *Master plate* numerada. Nos tubos foram acrescentados: Tampão *Taq* DNA polimerase (1X); dNTPs (0,2 mM); MgCl₂ (1,5 mM); oligonucleotídeo sense universal T7 (0,2 µM); oligonucleotídeo universal antisense SP6 (0,2 µM) e *Taq* polimerase (1,25U/50µl). Esta mistura foi incubada em termociclador, para amplificação do inserto no seguinte protocolo: 95°C/5min (1ciclo); 95°C/30s – temperatura média das *Tms* dos primers diminuídos de 5°C/30s – 72°C/1min (35 ciclos); 72°C/10min (1 ciclo); 4°C/ infinito. O produto do *PCR* de colônia foi analisado em gel de agarose 1,5% ou 2%. E o resultado foi visualizado e registrado em aparelho de captura de imagem *Chemidoc*.

Mini preparação plasmidial

A partir da *Master plate* os clones escolhidos foram repicados com auxílio de pinça e palitos de madeira estéreis para um pré-inóculo em LB líquido com ampicilina (100 µg/ml) e incubado por 16h a 37°C (em incubadora 430 RDB tipo

shaker Nova Ética) em tubo de aeração. Cada cultura com crescimento saturado foi centrifugada (14000g por 1min) a temperatura ambiente e se obteve um sedimento bacteriano consistente. De cada um dos centrifugados bacterianos foi feita a extração do plasmídeo com auxílio de reagentes de Miniprep da Promega (*Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems*).

Reação e análise do seqüenciamento

Foi utilizado o protocolo do seqüenciamento *Big Dye* com um volume total de reação de 10 µl. Destes 4 µl era o reagente *Big Dye* ou *Dye Namic* e os outros 6µl eram a somatória do volume de DNA molde, oligonucleotídeo e água estéril. A massa de plasmídeo utilizada dependia do tamanho do inserto, segundo *BigDye Terminator v3.1Cycle Sequencing Kit*. Cada clone foi submetido à duas reações de seqüenciamento, uma utilizando o iniciador universal sense e outra o iniciador universal antisense. Essas reações foram levadas em termociclador de placa à 95°C/20min - 50°C/15s - 60°C/1min (29ciclos); 4°C/i nfinito. A precipitação foi realizada com acetato de amônio 7,5 M e etanol absoluto. Deixando secar 16h em ambiente escuro. O produto foi ressuspenso em formamida para a leitura em sequenciador 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems). O resultado do seqüenciamento foi analisado em *software Chromas Pro 2.1*, o alinhamento das seqüências realizado através do *Clustalw* <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>> e a seqüência mais representativa analisada usando a ferramenta *BLAST* <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.

Análise da seqüência da proteína madura

A seqüência nucleotídica obtida foi traduzida e analisada no programa *ProtParam* (disponível no site: <<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>>) para predição de peso molecular e ponto isoelétrico da proteína. O alinhamento com seqüências protéicas de outras espécies (*GenBank*, acesso no site <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>>) que apresentaram alta identidade e foi realizada pelo site *Clustalw* <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>>.

PCR com *Pfu* DNA polimerase

Com base nos resultados dos sequenciamentos, particularmente do fragmento amplificado com o oligonucleotídeo “PLA₂ Lonomia Sense” que revelou a sequência nucleotídica a partir da região de peptídeo sinal, foram desenhados iniciadores sense e antisense cada um contendo um sítio de restrição para enzimas de restrição diferentes (*Forward* - *Nde*I: CGC CAT ATG CAG ATT AAT AAT GTC G e *Reverse* *Bam*HI: AT GGA TCC GTG TTA CAA GGA TTC) para a amplificação do cDNA específico que contém a seqüência madura da toxina. Foi realizado uma reação de transcrição reversa com oligo(dT)₁₇adaptor nas condições descritas no tópico 3.6.1. Com o cDNA resultante, os *primers* específicos nas concentrações de 0,2 µM e *Pfu* DNA polimerase (1,25U/50µl), o PCR foi executado em termociclador nas seguintes condições: 94°C/2min (1 ciclo); 94°C/ 30s, 55°C/30s para hialuronidase e 60°C/30s, 72°C/3min (35 ciclos); 72 °C/5min (1 ciclo); 4°C/ infinito. Em volume final de reação de 50µl. As etapas de digestão, ligação, transformação e PCR de colônia foram realizadas do mesmo modo que descrito anteriormente.

Subclonagem em vetor pET-14b

O produto da reação anterior foi submetido à corrida em gel de agarose, o fragmento foi extraído e digerido com as enzimas de restrição específicas, utilizando o seguinte protocolo: Tampão Tango (2x); 5 U de *Nde*I e *Bam*HI por 16h a 37°C em banho-maria. Após a digestão com as enzimas de restrição, para dificultar a recircularização do plasmídeo caso uma das enzimas não tenha sido eficiente, foi feito o tratamento com uma 5'fosfatase (*CIAP*) segundo o protocolo: 10pmol do plasmídeo ou mais, Tampão *CIAP* (1x), 1µL de *CIAP* em um volume de 50µL incubados a 37°C /30min e inativação da enzima a 85 °C/15min. Tanto o inserto quanto o vetor digeridos foram purificados por extração em gel e submetidos à ligação com Tampão ligase (1x) e T4 DNA ligase (5U/µl) em bloco de aquecimento a 16°C por 16h. O produto da ligação foi transformado em DH5α e para avaliar se as colônias transformadas continham o inserto foi realizado *PCR* de colônia com primers universais do plasmídeo pET-14b.

E.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O envenenamento dos seres humanos resultantes do contato com as lagartas da espécie *Lonomia obliqua* tem sido investigado desde a eclosão de vários casos no sul do Brasil em 1989. Distúrbios hemorrágicos são freqüentemente observados e são caracterizados por uma coagulopatia de consumo seguida de fibrinólise secundária como mencionado anteriormente. Além disso, hematúria, anúria, oligúria e insuficiência renal têm ocorrido em vários casos com alta taxa de mortalidade. Casos de hemólise intravascular também foram relatados durante envenenamento humano e a atividade hemolítica tem sido atribuída à presença de uma fosfolipase A₂ no extrato das cerdas dessa lagarta. Aqui nesta tese, realizamos a clonagem de uma isoforma de PLA₂ presente nas cerdas da *L. obliqua*, com futuras perspectivas para a sua obtenção na forma recombinante para avaliação das suas propriedades bioquímicas e biológicas.

3'RACE para obtenção da sequência codificante da fosfolipase A₂ de *L. obliqua*

Visto o obstáculo da quantidade de material no estudo do extrato das cerdas de *L. obliqua* e a dificuldade de obtenção das suas frações purificadas, optou-se para a utilização das ferramentas de biologia molecular para a obtenção de uma isoforma presente nas cerdas. Os primers específicos para obtenção dessa sequência a partir do RNA total foram desenhados com base em uma sequência provável de PLA₂ do transcriptoma de *L. obliqua* (Veiga *et al.*, 2005). Como já descrito, foram desenhados dois primers forward (ATG TTG AAA TTA ACT GTA GGT) e (AGG AAC AAA ATG GTG CGG TTC) utilizados na reação de amplificação da sequência de PLA₂ após reação de RT-PCR com primer oligo dT, já que o mRNA de interesse possui uma cauda poli-A 3'. Utilizamos a temperatura (*T_m*) 55°C, visto que Sambrook e Russel (2001) sugerem que as temperaturas de anelamento situem-se entre 50 - 58 °C para o 3' RACE e sejam 5 °C menores que as *T_m*s calculadas; os parâmetros de % de CG, formação de “grampo” e dímeros estavam adequados. Tendo sido sintetizados os *primers*, para a obtenção do cDNA específico correspondente à LoPLA₂ foi necessário, primeiramente, extrair o RNA total das cerdas de *L. obliqua*, uma vez que este tecido contém as maiores

concentrações de toxinas no animal (principalmente as cerdas são inseridas na pele da vítima quando do acidente).

De todo RNA produzido por uma célula, cerca de 80-85% corresponde ao RNA ribossômico e uma pequena porcentagem, cerca de 1-5% corresponde ao RNA mensageiro (Alberts, Johnson *et al.*, 2002). No perfil da eletroforese do RNA total (Figura 32) existe uma banda de grande intensidade que corresponde ao RNA ribossômico. Bandas de pouca intensidade de tamanhos variados, visualizadas quase que como um borrão, que corresponde aos RNAs mensageiros.

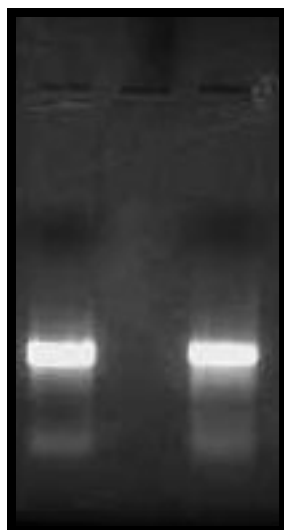


Figura 32: RNA total das cerdas produtoras de veneno de *L. obliqua*. RNA total extraído das cerdas de 50 lagartas *Lonomia obliqua*. Perfil obtido em eletroforese de agarose 1%.

No perfil de RNA total eucariótico, geralmente espera-se de 2 à 3 bandas bem definidas, duas das quais de maior intensidade correspondentes aos RNAs ribossômicos de 18s e 28s (PROMEGA *RNA Analysis Notebook*). No entanto este é o perfil sempre observado de RNA total íntegro dos artrópodes. Este perfil difere significativamente do valor de referência padrão dos rRNA 28s, já que a maioria dos insetos contém um endógeno “hidden break”. Após a desnaturação, as pontes de hidrogênio são rompidas, lançando dois fragmentos de tamanho semelhante que tanto migrar em estreita colaboração com o rRNA 18s. O perfil de rRNA resultando, portanto, reflete a composição endógena de rRNA de insetos e não deve ser interpretado como de degradação (Winnebeck, Millar *et al.*, 2010). O RNA total

obtido foi dosado e sua relação à concentração protéica foi de 1.8, considerada ideal segundo Sambrook e Russel (2001). Para as reações de transcrição reversa foram sempre utilizados 1 µg de RNA total conforme já padronizado no laboratório em outros trabalhos.

Na figura 33A, pode-se visualizar a eletroforese em agarose dos produtos finais da reação de 3' RACE para a obtenção da LoPLA₂ de *L. obliqua*. A coluna à esquerda do marcador se refere ao fragmento amplificado utilizando o primer “PLA₂ Lonomia Sense”, que foi desenhado para anelar na região do peptídeo sinal.

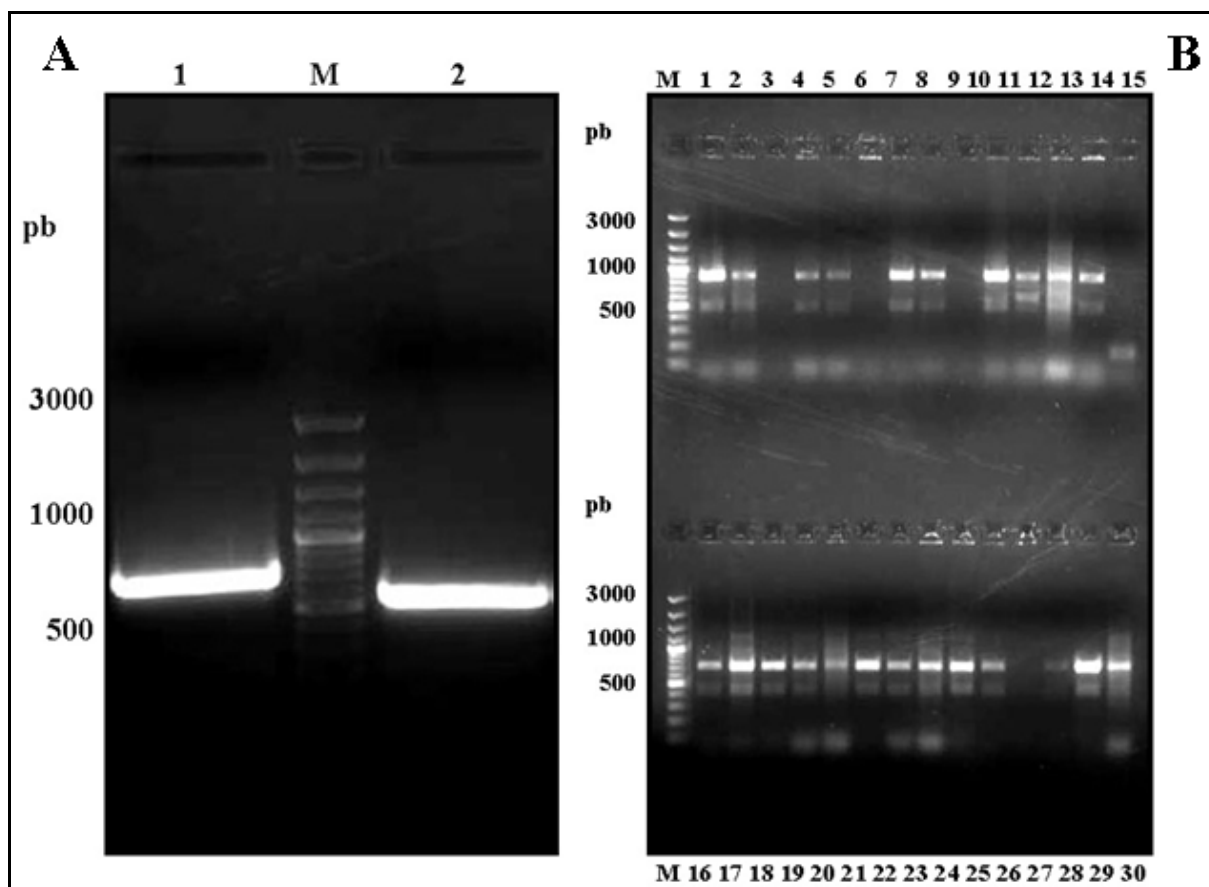


Figura 33: 3' RACE da fosfolipase A₂ *L. obliqua*. (A) Eletroforese em agarose 1% mostra os produtos da reação de 3' RACE. Na coluna 1 o fragmento amplificado utilizando o primer “PLA₂ Lonomia Sense” (anela na região no peptídeo sinal) e na coluna 2 o fragmento amplificado utilizando o primer “3' RACE PLA₂ Lonomia” (anela em uma região mais central da sequência). (B) PCR de colônia da construção pGEM-T + fragmento resultante da reação 3'RACE em bactérias *E.coli* DH5α eletrocompetentes. As colunas 1 – 15 se referem à construções feitas com o fragmento mostrado na coluna 1 da figura 33A. As construções que contém o inserto apresentam banda na altura de 900 pares de base. As colunas 16 – 30 se referem à construções feitas com o fragmento mostrado na coluna 2 da figura 33A. As construções que contém o inserto apresentam banda na altura de 800 pares de base. Os clones 1, 7, 10, 18, 21 e 24 foram submetidos ao sequenciamento.

Observa-se um fragmento com tamanho aproximado de 550 pares de base, claramente maior do que a banda observada na coluna à direita do marcador, que mostra o perfil do fragmento amplificado utilizando o primer “3’ RACE PLA₂ Lonomia”, desenhado para anelar numa região mais central da sequência. Como o tamanho das fosfolipases A₂ de veneno de espécies de vespas, abelhas e formigas consideradas espécies “próximas” à mariposa, variam bastante, não se tinha idéia do tamanho exato da banda. Sendo assim, prosseguiu-se com o trabalho e esta banda foi extraída com auxílio de kit apropriado e ligada em vetor de clonagem pGEM-T. A construção obtida foi transformada em *E. coli* DH5α eletrocompetentes e para a triagem foi utilizado o sistema de α-complementação, no qual colônias incolores provavelmente contém inserto e colônias azuis não. A figura 33B mostra o gel do PCR de colônia, sendo que as colunas superiores se referem à construções feitas com o fragmento amplificado a partir da região do peptídeo sinal e as inferiores com o fragmento amplificado a partir de uma região mais central da sequência. Obteve-se 23 colônias positivas no PCR e dessas, 3 clones de cada construção foram sequenciados. Os resultados obtidos após o seqüenciamento dos clones positivos mostraram seqüências nucleotídicas com 100% de identidade entre si. A sequência resultante foi comparadas com outras seqüências putativas de PLA₂ de *Lonomia obliqua* depositadas nos bancos de dados, como mostra a figura 34. Como mostra a figura, a sequência resultante do 3’ RACE apresenta uma porção 3’ maior do que as outras seqüências, embora seja muito semelhante à sequência do transcriptoma, na qual se baseou para o desenho dos primers, e da LOAH10B10. A sequência da LOAH04E03 difere bastante das outras três seqüências. Uma predição da ORF da sequência da PLA₂ obtida pelo 3’ RACE mostra uma sequência completa de 546 bases que, traduzida, tem 181 aminoácidos (Figura 35) com massa molecular predita de cerca de 20,8 kDa. Uma análise de predição da presença de peptídeo sinal utilizando o software SignalP mostra um peptídeo sinal provável de 23 aminoácidos, que geraria uma proteína madura com 158 aminoácidos, cerca de 18,3 kDa e com ponto isoelétrico teórico de 9.15. Seibert e colaboradores (2006) purificaram uma fosfolipase A₂ de extrato de cerca de *L. obliqua* e demonstraram que ela tem uma mobilidade eletroforética aparente de 15 kDa. Veiga e colaboradores (2005), com base na sequência predita de PLA₂ foi calculada uma massa molecular teórica de cerca de 9,6 kDa sem o peptídeo sinal.

PLA2-3'RACE	1	-----ATGTTGAAATTAAC-TGTAGGTGCA-ATAGTCTTT
PLA2Transcriptome	1	-----ATGTTGAAATTAAC-TGTAGGTGCA-ATAGTCTTT
LOAH10B10	1	ACATTTTAGATTTTATTAGATCAAAATGTTGAAATTAAC-TGTAGGTGCA-ATAGTCTTT
LOAH04E03	1	-----AGCTGAGCTAATATATTTATTTAATACAAAAATGTACGTTATTAATG
PLA2-3'RACE	34	GTTGCTTTAATA-TGTCC-TCGCTATTGTCAGAGTATTAATAATGTGCGACTACAGGAAGC
PLA2Transcriptome	34	GTTGCTTTAATA-TGTCC-TCGCTATTGTCAGAGTATTAATAATGTGCGACTACAGGAAGC
LOAH10B10	59	GTTGCTTTAATA-TGTCC-TCGCTATTGTCAGAGTATTAATAATGTGCGACTACAGGAAGC
LOAH04E03	47	ATAGCTTTAATCTGTTTTCGCT-TTCTTTAATTACTGTAATGTTTTCG-CATGAGTT
PLA2-3'RACE	92	TCCTCTTAGATCCAAACGTCGAATCCTGATGATGTAGATTTTAAATTT---ATTTTATTTTC
PLA2Transcriptome	92	TCCTCTTAGATCCAAACGTCGAATCCTGATGATGTAGATTTTAAATTT---ATTTTATTTTC
LOAH10B10	117	TCCTCTTAGATCCAAACGTCGAATCCTGATGATGTAGATTTTAAATTT---GTTTATTTTC
LOAH04E03	105	ACGAAATGGAAAGCGACGATAAGGCTGATAACTTGGATTTTAAACTGCAAAATTAATATC
PLA2-3'RACE	149	CGGGAACAAAATGGTGCGGTTTCAGGAGATAAGGCTAAAAATTACACAGACTTAGGGAGAC
PLA2Transcriptome	149	CAGGAACAAAATGGTGCGGTTTCAGGAGATAAGGCTAAAAATTACACAGACTTAGGGAGAC
LOAH10B10	174	CGGGAACAAAATGGTGCGGTTTCAGGAGATAAGGCTAAAAATTACACAGACTTAGGGAGAC
LOAH04E03	165	CAGGTACAAAATGGTGCGGCAATGACGACATAGCAATGATTACCAGATGTCGGACCGT
PLA2-3'RACE	209	AGGTAGCAACTGACATGTGCTGCAGACAGCACAACCACTGTCAGATATTATACGTTCTG
PLA2Transcriptome	209	AGGTAGCAACTGACATGTGCTGCAGACAGCACAACCACTGTCAGATATTATACGTTCTG
LOAH10B10	234	AGGTAGCAACTGACATGTGCTGCAGACAGCACAACCACTGTCAGATATTATACGTTCTG
LOAH04E03	225	TTAAGCTGCGGATTAATGCTGCAGCGTCCATGATCACTGCGCTTATATCATACCGGCAA
PLA2-3'RACE	269	GAGA-AAACAAACACGGCTTAATAAACAGCGGACATCATACGAAGGTGAATTGTGAATGT
PLA2Transcriptome	269	GAGAGAACCAAAACACGGCTTAATAAACAGCGGACATCATACGAAGGTGAATTGTGA----
LOAH10B10	294	GAGA-AAACAAACACGGCTTAATAAACAGCGGACATCATACGAAGGTGAATTGTGAATGT
LOAH04E03	285	GGAA-GAGCAGATACAAATCTTGTCAACACCGCGGCTTACTCGAGACTACAGTGCATGTGT
PLA2-3'RACE	328	GACACAGTTTTCAAGAAATGTTTAATAGAAAGCTAACAGTAAACAGCTAATCCCGTATTT
PLA2Transcriptome		-----
LOAH10B10	353	GACACAGTTTTCAAGAAATGTTTAATAGAAAGCTAACAGTAAACAG-----
LOAH04E03	344	CATTATGCAATTTAAGAAATGTTTAATAGATTCACACAGCAAGATAGCCAAAGCTATCGGT
PLA2-3'RACE	388	AAATATATTTTACTTTTCGCGAAAGAAATGCTTGAATACACATTTCCCTAGCCAATGT
PLA2Transcriptome		-----
LOAH10B10		-----
LOAH04E03	404	CATATATATTTTCATATAATGGGAAACGAAATGTTT-----
PLA2-3'RACE	448	ATTCAAAAACAGGAGTTTGTAGAGGGCATGTAAAAAATACACATATGATAAAAAACGA
PLA2Transcriptome		-----
LOAH10B10		-----
LOAH04E03		-----
PLA2-3'RACE	508	AGTGACAGTTATCAATGGTTTGACCTTGAATCATTGTAA
PLA2Transcriptome		-----
LOAH10B10		-----
LOAH04E03		-----

Figura 34: Alinhamento das sequências nucleotídicas de *Lonomia obliqua* semelhantes à fosfolipase A₂. “PLA2 3’RACE” se refere à sequência clonada a partir do 3’ RACE desta tese. “PLA₂ Transcriptome” se refere à sequência semelhante à PLA2 de *L. obliqua* adquirida após análise do transcriptoma de cerdas de *L. obliqua* por Veiga e colaboradores (2005). “LOAH10B10” e “LOAH04E03” se referem à sequências de ESTs geradas por uma biblioteca de cDNA construída a partir de extrato de cerdas de *L. obliqua* por Reis e colaboradores (2005). O códon assinalado com uma estrela (*) é o códon de iniciação e aquele indicado por uma seta se refere ao provável códon de terminação da sequência codificante. As bases sombreadas em preto são idênticas nas quatro sequências. As bases sobreadas em cinza e sem sombra são as que não coincidem.

```

1 atgttgaaattaactgtaggtgcaatagtctttgttgctttaata
M L K L T V G A I V F V A L I
46 tgtcctcgctattgtcagagtattaataatgtcgactacaggaag
C P R Y C Q S I N N V D Y R K
91 ctctctcttagatccaaacgtcaatcctgatgatgtagattttaaa
L L L D P N V N P D D V D F K
136 tttattttatttccgggaacaaaatggtgcggttcaggagataag
F I L F P G T K W C G S G D K
181 gctaaaaattacacagacttagggagacaggttagcaactgacatg
A K N Y T D L G R Q V A T D M
226 tgctgcagacagcacaaccactgytcagatattatacgttctgga
C C R Q H N H C S D I I R S G
271 gaaaccaaacacggccttaataaacacggacatcatacgaagggtg
E T K H G L I N S G H H T K V
316 aattgtgaatgtgacagagttttcaagaaatgtttaatagaagct
N C E C D R V F K K C L I E A
361 aacagtaaaacagctaatagccgtattttaaaatatatttytacttt
N S K T A N A V F K I Y F Y F
406 ctggcaaagaaatgctttgaatacacatttcttagccaatgtatt
L A K K C F E Y T F P S Q C I
451 caaaaaacaggagtttytagaagggtcatgtaaaaatacacatat
Q K T G V X R R A C K K Y T Y
496 gataaaaaacgaagtgcacgttatcaatggtttgaccttgaatca
D K K R S A R Y Q W F D L E S
541 ttgttaa 546
L *
```

Figura 35: Sequência codificante teórica da LoPLA₂ (Open Reading Frame). A sequência nucleotídica foi submetida à análise pela ferramenta “ORF Finder” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) que gerou uma ORF de 546 nucleotídeos e 181 aminoácidos. A análise da sequência aminoacídica predita pela ferramenta “SignalP 3.0 Server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) revelou um provável peptídeo sinal de 23 aminoácidos. O primeiro resíduo da provável proteína madura está circulado em vermelho.

Outras análises demonstraram que a LoPLA₂ pode formar 5 pontes dissulfeto e possui um possível sítio de N-glicosilação (NYT). Além disso, segundo o banco de dados *Pfam* e *ProSite* é classificada dentro de uma família de fosfolipase A₂ com histidina no sítio ativo (**CRQHNHCSD**) e dependente de cálcio (sítio ligante - **TKWCGSGD**) (Roberts, 1996; Hariprasad, Kumar *et al.*, 2011).

Com base nessa sequência aminoacídica codificante predita, foi feita uma análise comparativa com outras sequências de fosfolipases A₂ de outras espécies disponíveis nos bancos de dados e concluiu-se que provavelmente essa PLA₂ de *L. obliqua* pertence ao Grupo III das Fosfolipases A₂, como está ilustrado na figura 36.

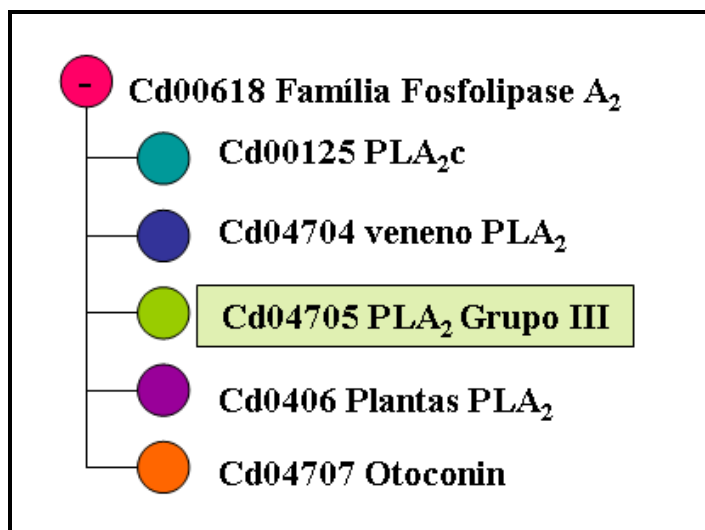


Figura 36: A fosfolipase A₂ de *Lonomia obliqua* pertence ao grupo III de PLA₂ (cd04705). A sub-família de fosfolipase A₂ semelhante à humana grupo III, é uma família de enzimas secretadas e enzimas citosólicas são dependentes Ca²⁺. Enzimaticamente ativas, clivam a posição sn-2 do glicerol de fosfolipídios. As PLA₂s secretadas também foram demonstradas como capazes de se ligar especificamente a uma variedade de proteínas solúveis e de membrana de mamíferos, incluindo alguns receptores. Como toxinas, as PLA₂s desse grupo são potentes que bloqueiam terminais nervosos, ligando-se à membrana do nervo e hidrolisando os fosfolipídios da membrana. Os produtos da hidrólise não formam bicamadas levando a uma mudança na conformação da membrana e, finalmente, a um bloqueio na liberação de neurotransmissores. Podem apresentar atividade inflamatória, alérgica, miotóxica e hemotóxica. Essas PLA₂s podem formar dímeros ou oligômeros.

Dessa forma, um alinhamento foi feito para comparar a sequência da LoPLA₂ e outras PLA₂ do Grupo III de outras espécies e está ilustrado na figura 37. A análise do alinhamento mostra que as sequências apresentam alta similaridade entre si. Como fica claro na figura, as regiões do sítio catalítico e do sítio de interação com o cálcio são altamente conservadas entre todas as sequências analisadas. A localização dos resíduos de cisteína também é bastante conservada entre as sequências analisadas. A LoPLA₂ apresenta maior similaridade, cerca de 85% com a fosfolipase A₂ descrita no transcriptoma das cerdas da *Lonomia obliqua* (Veiga *et al.*, 2005). Essa positividade se concentra principalmente a região N-terminal, pois a região C-terminal da LoPLA₂ é mais longa. Verificou-se também que a LoPLA₂ das cerdas de *Lonomia obliqua* possui alta similaridade com espécies de outros artrópodes como as fosfolipases A₂ de abelhas (*Apis cerana cerana* e *Apis mellifera*), de mariposa (PLA₂ putative, *Lonomia obliqua*), de vespa (*Bombus ignitus*) e de carrapato (*Ixodes scapularis*).

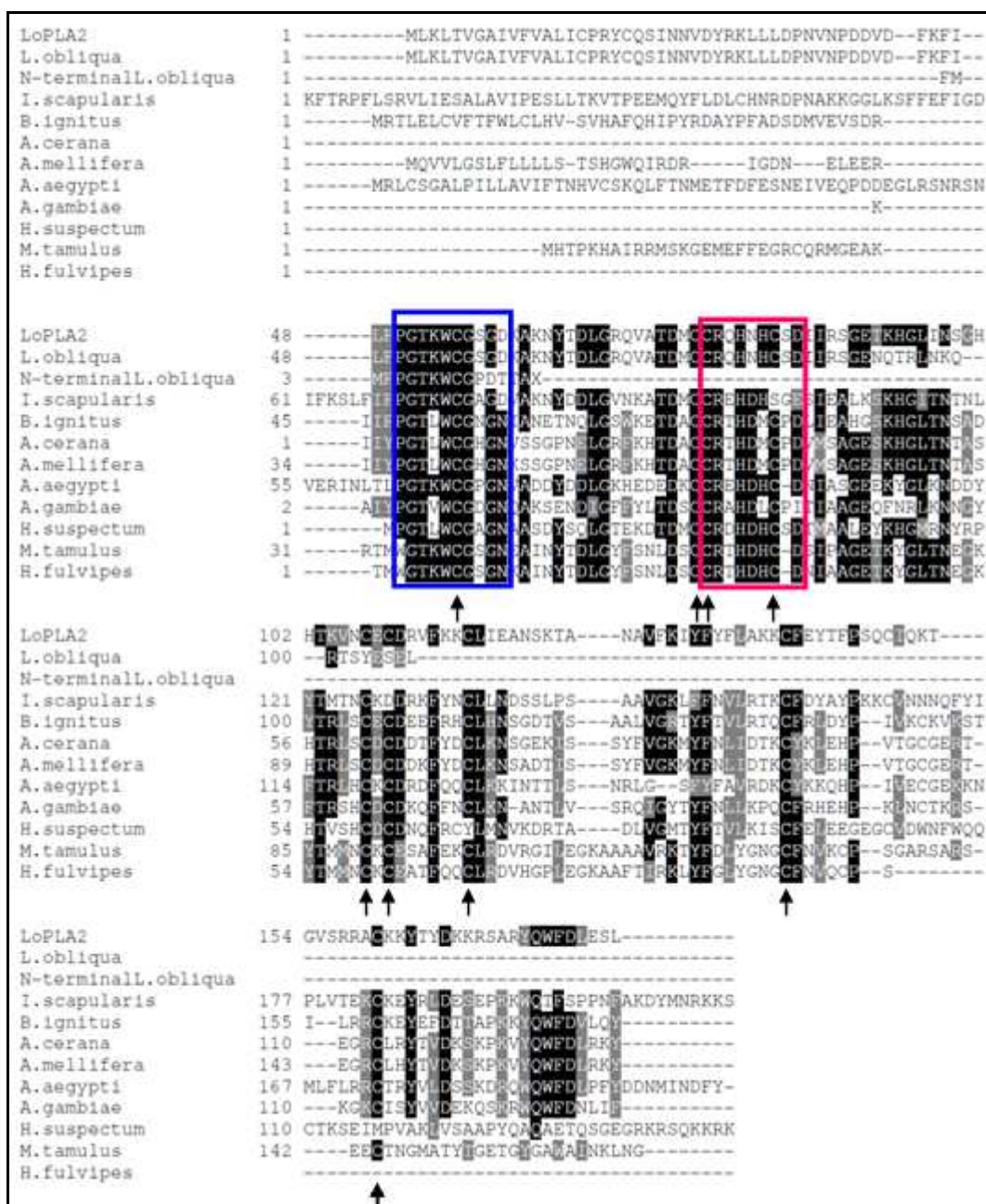


Figura 37: Similaridade da fosfolipase A₂ de *L. obliqua* com outras fosfolipases A₂ de artrópodes. O alinhamento foi obtido através do site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> e o sombreamento através da ferramenta http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html, na qual, a positividade cresce do branco para o preto. Em preto os aminoácidos conservados e em cinza substituições conservativas. O retângulo azul refere-se à região de ligação ao cálcio, enquanto o retângulo rosa refere-se ao sítio catalítico. As flechas indicam as possíveis pontes dissulfeto. A LoPLA₂ foi comparada com as seqüências de PLA₂ de abelhas (*Apis cerana cerana* e *Apis mellifera*), de mariposa (PLA₂ putative, *Lonomia obliqua*), de vespa (*Bombus ignitus*), de carrapato (*Ixodes scapularis*), de mosquitos (*Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*) e de escorpiões (*Heterometrus fulvipes*, *Mesobuthus tamulus*).

As fosfolipases presentes em venenos vêm sendo amplamente estudadas devido à variedade e a importância de seus efeitos farmacológicos, como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, ativação e/ou inibição da agregação plaquetária, anticoagulação, edema, convulsão, hipotensão, hemorragia interna e hemólise dentre outras (Kini, 2003; Veiga, Ribeiro *et al.*, 2005). O Grupo III, que é uma subcategoria da família de fosfolipases A_2 secretadas, apresenta especificidade enzimática para fosfatidiletanolaminas e fosfatidilcolina. Ocorrem como componentes de venenos e como fosfolipases A_2 secretadas em mamíferos. A criação deste grupo está baseada nas semelhanças dos determinantes estruturais das enzimas, inclusive um domínio amino-terminal longo, um domínio específico do grupo III conservado e um domínio carboxi-terminal longo.

Foi feito também um cladograma que ilustra a proximidade e semelhança da LoPLA₂ com fosfolipases A_2 de outras espécies de artrópodes (Figura 38). Pode-se observar a nova toxina LoPLA₂ de *Lonomia obliqua* está bastante relacionada com as fosfolipases A_2 de mariposas e escorpiões.

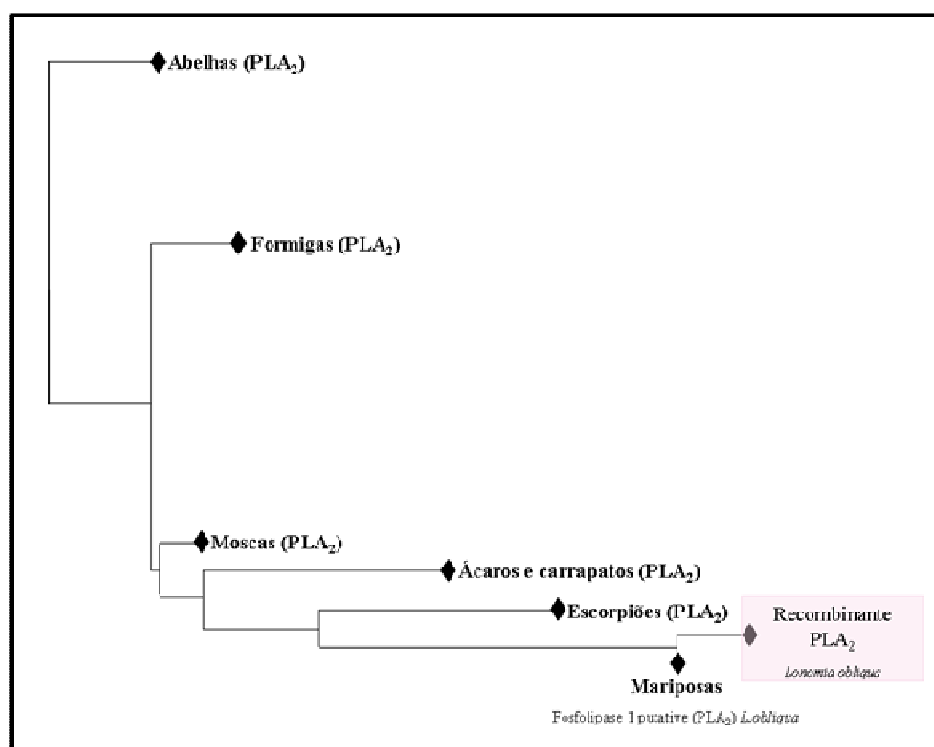


Figura 38: Cladograma que ilustra a semelhança entre algumas fosfolopases A_2 de artrópodes. Análise comparativa foi realizada com seqüências conhecidas de fosfolipases A_2 do GenBank. As seqüências foram alinhadas com ClustalW, e a árvore filogenética foi construída pelo programa MEGA usando o algoritmo de “neighbor-joining” e testado por um “bootstrap” com 1000 repetições.

Na tabela 6 estão ilustradas as porcentagens de similaridade da LoPLA₂ com algumas PLA₂. A seqüência da PLA₂ presente no veneno do escorpião *Heterometrus fulvipes* apresentou cerca de 50% de similaridade com LoPLA₂, enquanto o escorpião *Mesobuthus tamulus* apresentou 31% de identidade e a abelha *Apis cerana* apresentou similaridade de 40%. A maioria das características essenciais do grupo III de PLA₂ é vinculada a conservação do loop ligante de cálcio e catalítico.

Nome	Número de aminoácidos	Positividade com a PLA₂ Lonomia obliqua
<i>Lonomia obliqua</i> PLA ₂ (putativa 1)	107	85%
<i>Heterometrus fulvipes</i> PLA ₂ (veneno)	103	50%
<i>Apis cerana</i> PLA ₂ (veneno)	134	40%
<i>Apis mellifera</i> PLA ₂ (veneno)	167	32%
<i>Ixodes scapularis</i> PLA ₂ (putativa)	416	32%
<i>Mesobuthus tamulus</i> PLA ₂ (veneno)	167	31%
<i>Aedes aegypti</i> PLA ₂ (secretada)	203	29%
<i>Heloderma suspectum</i> PLA ₂ (toxina 1)	147	29%
<i>Bombus ignitus</i> PLA ₂ (veneno)	180	28%
<i>Anopheles gambiae</i> PLA ₂ (predita)	197	28%

Tabela 7: Identidade aminoacídica entre a fosfolipase A₂ de *L. obliqua* com outras de diferentes espécies.

A sequência consenso obtida a partir do sequenciamento serviu de base para o desenho dos *primers* para a produção do fragmento da proteína madura com os sítios de restrição nas extremidades. São eles: *Forward NdeI LoPLA₂* – 5' CGC CAT ATG CAG ATT AAT AAT GTC G 3' (25mer; 40%GC; 61,9°C) e *Reverse BamHI LoPLA₂* – 5' AT GGA TCC GTG TTA CAA GGA TTC 3' (23mer, 43,5%GC; 62,1°C). A região de anelamento dos primers está ilustrada na figura 39.

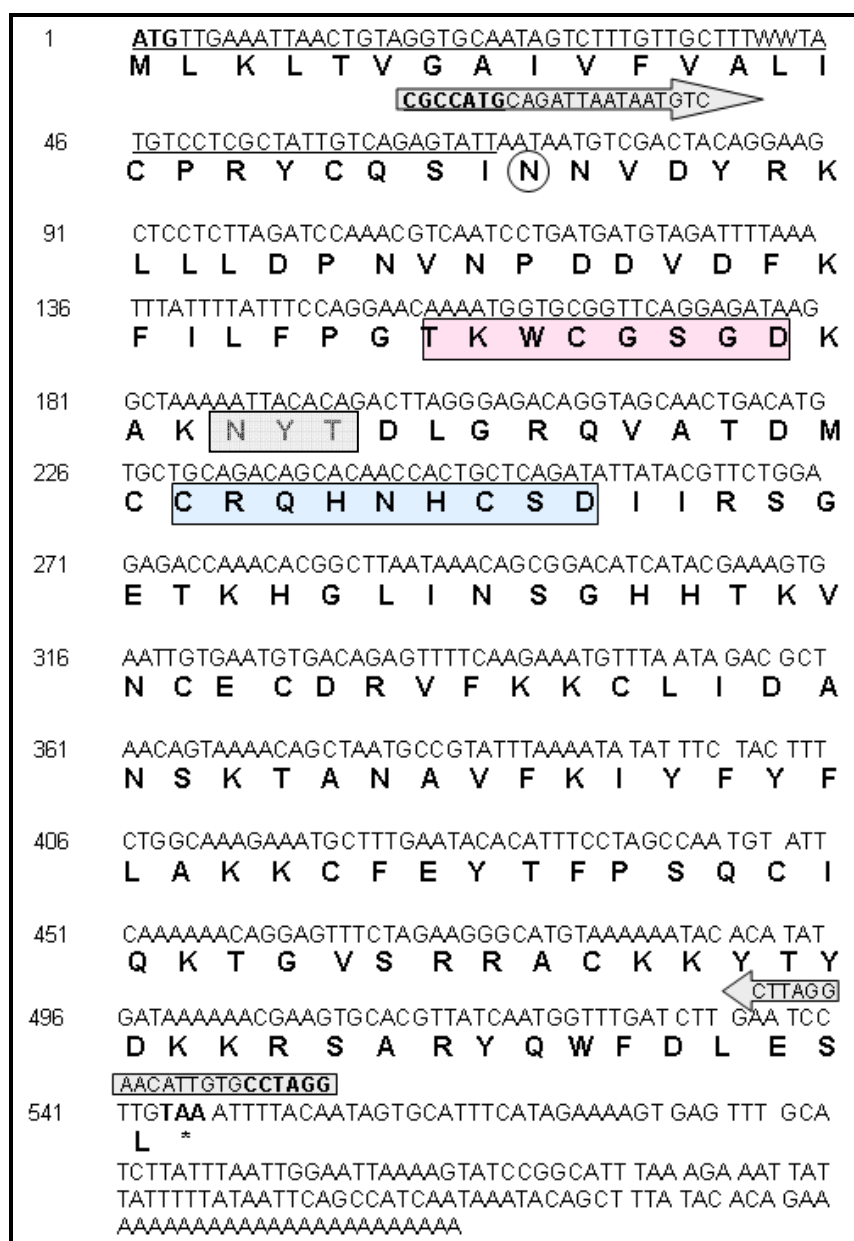


Figura 39: Sequência nucleotídica e aminoacídica da Fosfolipase A₂ de *Lonomia obliqua*. A sequência específica dos *primers* para a subclonagem molecular está dentro das setas. Os sítios de restrição das enzimas NdeI (oligonucleotídeo sense) e BamHI

(oligonucleotídeo anti-sense) estão em negrito. Os códons de iniciação (ATG) e terminação (TAA) estão em negrito. O resíduo de asparagina (N) que indica o início da proteína madura está destacado pelo círculo. A sequência em destaque sublinhada representa o peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático. Os retângulos representam possíveis sítios de N-glicosilação (cinza), de ligação ao íon Ca^{2+} (rosa) e de atividade catalítica (azul).

Clonagem da Fosfolipase A_2 madura de *Lonomia obliqua*

Com o intuito de clonar a sequência completa da toxina madura e obter um fragmento com sequência mais fidedigna, foram utilizados para reação de PCR que seguiu a reação de RT-PCR: primers *Forward* e *Reverse* citados acima e a enzima *Pfu* DNA polimerase. O fragmento foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% e gerou uma banda específica na altura esperada para o fragmento amplificado (474pb) (Figura 40).

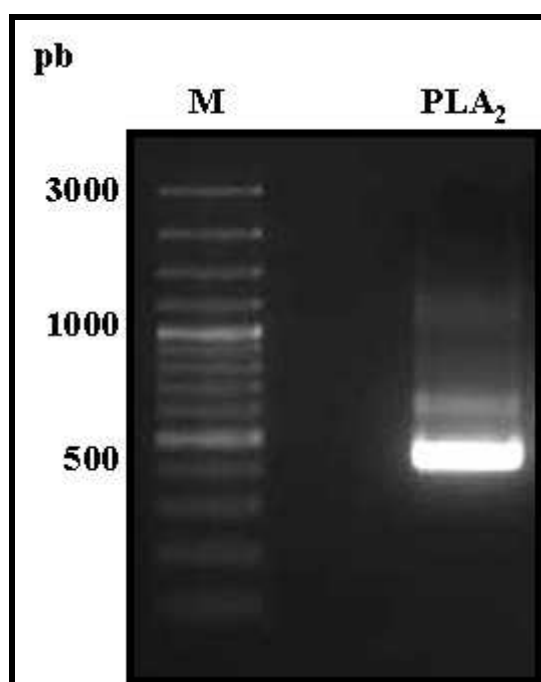


Figura 40: Fosfolipase A_2 de *Lonomia obliqua* (LoPLA₂). Eletroforese em agarose 1,5% mostra o produto da amplificação com a enzima *Pfu* DNA pol do fragmento codificante para a LoPLA2 contendo os sítios de restrição para *Nde*I e *Bam*HI. Observa-se uma banda com altura semelhante à sequência predita (474pb), codificante da enzima madura.

Subclonagem da fosfolipase A₂ de *Lonomia obliqua*.

Durante os últimos dois anos têm crescido o número de estudos de expressão e resolução de estruturas tridimensionais de toxinas de veneno e estes estudos têm nos ajudados a entender os mecanismos moleculares dos efeitos desencadeados pelo envenenamento (Arlan, 2002; Hoffman, 2008).

Para obter a expressão da PLA₂ de *L. obliqua* foi escolhido inicialmente o sistema mais simples de expressão, o bacteriano, pois é um sistema relativamente simples de se trabalhar quando comparado a sistemas eucarióticos (Soldatova, Crameri *et al.*, 1998; Ramos, Cheong *et al.*, 2001; Teo, Ramos *et al.*, 2006).

Com isso, escolheu-se promover a subclonagem da toxina do veneno de *L. obliqua* em plasmídeo pET-14b (Da Silveira *et al.*, 2006, 2007; Appel *et al.*, 2008), já outras enzimas previamente foram enzimaticamente ativas. Este sistema plasmidial fusiona uma cauda de 6 histidinas (His6x) à proteína recombinante de interesse o que permite a purificação desta em uma única etapa cromatográfica geralmente. Sendo assim, pET-14b foi o plasmídeo de escolha para a expressão. Dentre o sítio de clonagem múltiplo existente no pET-14b foram escolhidas as enzimas NdeI e BamHI, pois desta forma se preservaria regiões importantes tais como a sequência de ligação ao ribossomo (rbs). Outros motivos da escolha destas enzimas foram por estas não possuírem sítios de reconhecimento muito longos, uma boa atividade relativa (<<http://home.medewerker.uva.nl/d.rijnsburger/bestanden/poster2006.pdf>>) e a sequência do cDNA da toxina não ser reconhecida por estas enzimas. Como o sistema escolhido é procariótico, o qual não possui retículo endoplasmático, os *primers* foram desenhados a partir do primeiro aminoácido da proteína madura até o código de terminação. Optou-se por digestão dupla em tampão TANGO 2X à 37°C por 16 horas. A digestão do inserto e do vetor podem ser visualizadas na figura 41.

Extraíram-se as bandas do gel de agarose e promoveu-se a ligação do inserto com o vetor, na proporção de (5:1), à 16°C por 16 horas. Posteriormente essa ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase foi precipitada, para purificar a construção.

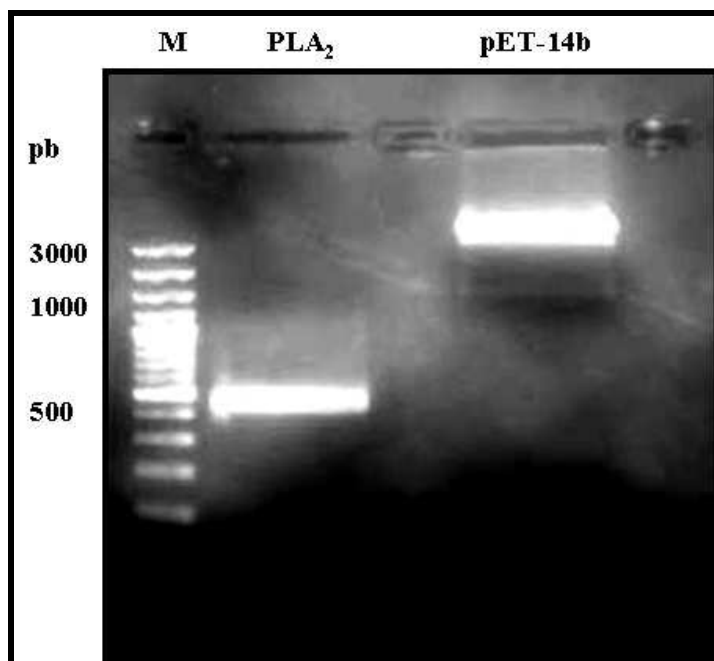


Figura 41: Digestão dupla. A digestão foi realizada em TANGO 2X com BamHI e NdeI à 37°C por 16 horas.

A partir disso, transformaram-se bactérias *E. coli* DH5α e os clones obtidos foram utilizados para um PCR de colônia utilizando os primers do vetor. Na figura 42, podemos visualizar alguns dos clones testados (180 colônias), porém infelizmente todas negativas. Nenhuma apresentou banda na altura do inserto. Acredita-se que esse infortúnio se deva à dupla digestão. Nosso próximo passo será aperfeiçoar a digestão e promover a expressão.

As PLA₂ e suas isoformas oferecem um grande desafio para os pesquisadores, no sentido de desvendar a sua estrutura e função. Pesquisas nesta área auxiliarão a determinar os mecanismos dos efeitos farmacológicos, bem como ampliar nosso conhecimento sobre o mecanismo de ação destas toxinas, seus efeitos deletérios, ou para efeitos contrários a algumas doenças importantes. Estes estudos são de extrema importância, pois podem subsidiar conhecimentos em áreas correlatas como o desenvolvimento de drogas para tratamento de vítimas de acidentes com animais peçonhentos, desordens hemostáticas, bem como para o desenvolvimento de novas drogas com ação bactericida e antitumorais.

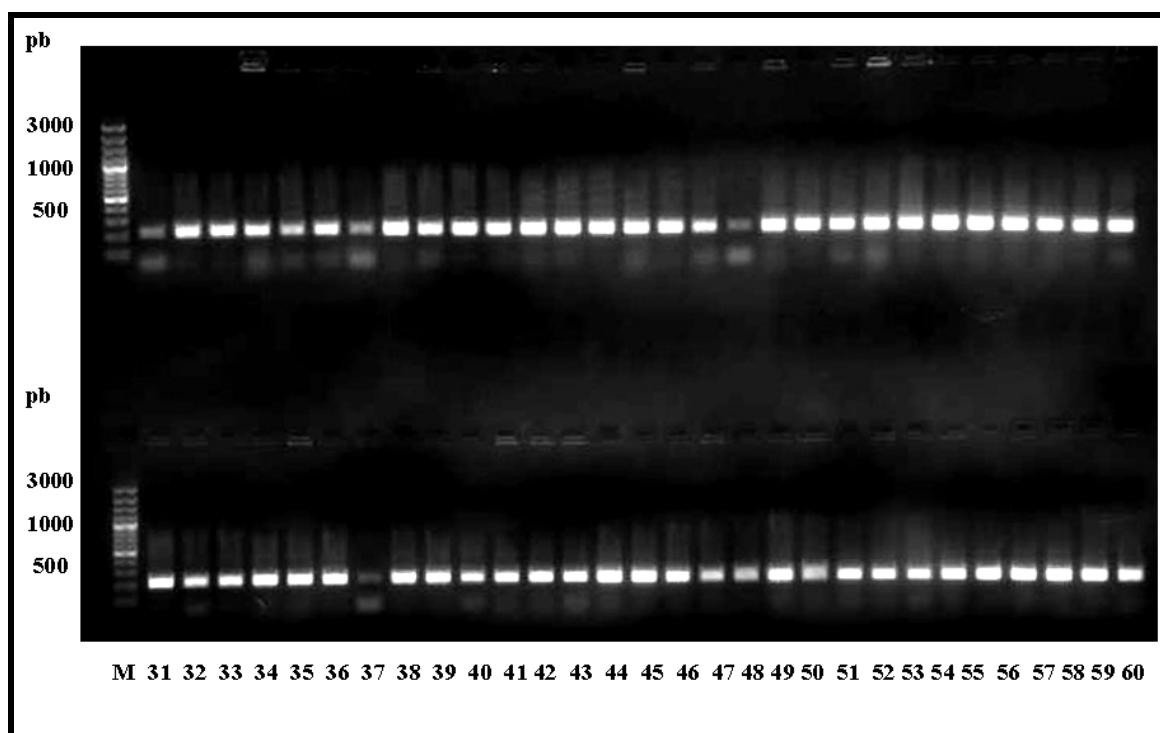


Figura 42: PCR de colônia. PCR da reação de ligação com *primers* universais do vetor. A Altura das bandas indica todos os clones vazios (negativos).

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

As fosfolipases presentes em venenos compreendem um grupo de enzimas de massas moleculares variáveis e são responsáveis por vários efeitos tóxicos induzidos em vítimas de acidentes com animais peçonhentos. No Brasil, existem vários animais peçonhentos de importância médica, como por exemplo, a aranha *Loxosceles* e a lagarta *Lonomia*.

Ao longo das últimas décadas, o aumento do número de notificações de acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* e com lagartas do gênero *Lonomia* tornaram-se uma preocupação em algumas regiões do país, particularmente no estado do Paraná. Apesar de existir, atualmente, uma série de informações biológicas e epidemiológicas que facilitam o diagnóstico desses acidentes, muitos aspectos fisiopatológicos da ação desses venenos permanecem pouco estudados, desconhecendo-se a sua importância e a participação de determinados sistemas e tipos celulares na sua patogênese. Os avanços em biologia molecular têm com a produção de toxinas recombinantes, permitido estudarem as proteínas de venenos isoladamente. A clonagem e expressão destas proteínas heterólogas possibilitaram a avaliação individualizada de proteínas que apresentam atividades sinérgicas e compõem a mistura protéica que forma os venenos.

As Fosfolipases formam uma classe de enzimas onipresente nesses venenos e que catalisam a hidrólise de fosfolipídios. Seus produtos são muitas vezes segundos mensageiros, que são altamente regulados pelas células. Cada família de fosfolipase apresenta uma especificidade a cada ligação éster dos fosfolipídios, podendo dessa forma liberar diferentes metabólitos e diversos modos de regulação. Dentre a grande variedade e complexidade dos mecanismos fisiopatológicos desencadeados, acredita-se que esses metabólitos envolvem proteínas citoplasmáticas, como a proteínas G, bem como diferentes lipídios efetores (como por exemplo, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, ceramida, ácido aracdônico entre outros) ou Ca^{2+} . O estudo mais aprofundado dessas interações é necessário para entender melhor o papel desses venenos e das suas toxinas para que se possa desenvolver melhores manobras terapêuticas e novas ferramentas com aplicações biotecnológicas.

O contato com lagartas do gênero *Lonomia*, desencadeia um quadro patológico bastante grave e relativamente comum nos estados do sul do Brasil,

porém os estudos das toxinas que constituem esse veneno são pouco entendidos e o mecanismo molecular pelo qual ocorre hemólise intravascular não foi completamente elucidado. Por isso, através de técnicas de biologia molecular, clonou-se uma isoforma de PLA₂ presente nas cerdas de *Lonomia obliqua*. Aparentemente a PLA₂ recombinante apresenta massa molecular 18 kDa, possui cinco pontes dissulfeto, sítio de ligação ao cálcio e sítio catalítico. Acredita-se que essa enzima terá alta atividade enzimática, já que os resíduos responsáveis pela catalise estão preservados e é apresenta positividade com outras PLA₂ que apresentam alta atividade catalítica. Embora tenhamos certa dificuldade na subclonagem e na expressão dessa toxina, será possível obter a PLA₂ de *L. obliqua* na sua forma recombinante. Com essa ferramenta biotecnológica poderemos promover estudos mais aprofundados das suas características bioquímicas e estruturais, assim como das suas funções biológicas e da sua participação no quadro patológico desenvolvido nas vítimas do contato com essa lagarta. Dessa forma será possível contribuir para o melhor entendimento desse envenenamento e para obter informações que contribuam para o tratamento do lominismo. Além disso, com a obtenção dessa toxina recombinante pode-se utilizá-la para biocatálise e em diversos setores industriais.

Os eventos patológicos observados nos casos de envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* já foram bastante estudados, porém os mecanismos moleculares exatos pelos quais o veneno exerce seus efeitos tóxicos ainda permanecem obscuros e sob constante investigação científica. Diversas proteínas presentes nos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* já foram descritas e estudadas, porém, somente a toxina dermonecrótica (esfingomielinase-D/fosfolipase-D) é capaz de reproduzir, isoladamente, as lesões dermonecróticas induzidas pelo veneno bruto. Sem dúvida, esta classe de toxinas é, por sua importância biológica, a toxina mais estudada e bem caracterizada no veneno. Bioquimicamente, as toxinas dermonecróticas são classificadas como fosfolipases-D (PLD), capazes de hidrolisar lisoglicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios gerando ácido lisofosfatídico (LPA) e ceramida-1-fosfato (C1P) (Lee e Lynch, 2005). Na busca pelo melhor entendimento do Loxoscelismo, nosso trabalho visa à avaliação da atividade biológica de toxinas dermonecróticas recombinantes e a relação desta atividade com os efeitos deletérios provocados pelo veneno de *Loxosceles intermedia* no acidente com as aranhas.

A atividade hemolítica do veneno de *L. intermedia*, bem como a participação das toxinas fosfolipases-D no evento de lise eritrocitária permanecia pouco compreendida. Os dados disponíveis eram escassos e, muitas vezes, contraditórios, o que tornava necessário o estudo mais aprofundado e detalhado do assunto no intuito de esclarecer o mecanismo pelo qual o veneno provoca hemólise intravascular. Apesar de o loxocelismo sistêmico ocorrer na minoria dos acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles*, a lise eritrocitária provocada é especialmente relevante considerando que esta é a reação sistêmica mais séria dentro do quadro clínico. Por isso tudo surgiu o interesse em avaliar a existência de atividade hemolítica direta (independente de complemento, isto é, livre de soro) do veneno de *Loxosceles intermedia* e quais seriam os possíveis mecanismos moleculares envolvidos neste processo. Outra curiosidade era a respeito da atividade enzimática das fosfolipases-D, se esta era essencial para os efeitos hematológicos observados no quadro loxoscélico. Os resultados obtidos com o veneno de *L. intermedia* e com a toxina LiRecDT1 no ensaio de atividade hemolítica *in vitro* (Item 1) evidenciam a participação da toxina dermonecrótica no efeito sobre os eritrócitos, sugerindo que esta classe de toxinas seria a grande responsável pelo efeito de lise celular observado nas nossas condições experimentais.

A participação do complemento tem sido relacionada com a hemólise induzida pelo veneno de *Loxosceles*. Estudos indicam que o envenenamento induz a ativação da via alternativa do complemento facilitando a hemólise mediada pelo complemento (Futrell, 1992; Da Silva *et al.*, 2004; Swanson e Vetter, 2006). Contudo nossos resultados que indicam uma ação hemolítica direta do veneno de *L. intermedia* e das toxinas dermonecróticas não descaracterizam a participação do complemento no evento hemolítico provocado pelo veneno já descrito. Na verdade, nossos dados sugerem que a atividade hemolítica direta das toxinas presentes no veneno de *L. intermedia* juntamente com a hemólise dependente de complemento atuam em sinergismo no evento hemolítico que segue os acidentes com aranhas de gênero *Loxosceles*.

A utilização da toxina mutada LiRecDT1 H12A, que apresenta redução drástica da atividade catalítica de fosfolipase-D e redução na capacidade de desenvolver dermonecrose em pele de coelhos, porém permanecendo com a sua capacidade de ligação à esfingomielina, ao colesterol e a alguns lisoefingolipídeos (Chaim, Da Silveira *et al.*, 2011) permitiu uma avaliação da participação do domínio

catalítico na atividade hemolítica. Os resultados obtidos com a utilização desta toxina recombinante sugerem que a atividade fosfolipásica está fortemente relacionada ao efeito hemolítico direto provocado pelo veneno de *L. intermedia*.

Outro ponto importante, vinculado à atividade lítica dessas toxinas, refere-se ao magnésio (Mg^{+2}) presente no sítio ativo. Nossos estudos confirmam dados anteriores que afirmavam que este íon desempenha papel-chave na coordenação e estabilização do grupo fosfato da esfingomielina durante a hidrólise, sendo bastante conservado entre espécies de aranha marrom (Murakami, Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2005; Murakami, Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2006; De Giuseppe, Ullah *et al.*, 2011; Ullah, De Giuseppe *et al.*, 2011). Obtivemos uma inibição praticamente total do efeito hemolítico com a utilização de EDTA, sendo equivalente ao controle negativo (sem toxina). Relacionamos estes dados experimentais à alta afinidade do EDTA por íons Mg^{+2} , sugerindo que ocorra o seqüestro deste íon do sítio catalítico da enzima. A ausência do Mg^{+2} promove a perda da atividade catalítica da enzima, justificando a inibição do efeito hemolítico. Logo, que o magnésio é essencial para estabilizar o grupo fosfato dos fosfolipídios durante a hidrólise e sua ausência resulta em perda da atividade enzimática das PLD.

Nossos dados mostram que os Sistemas ABO e Rh não interferem na atividade hemolítica direta de LiRecDT1. Esses dados descartam a possibilidade de os Sistemas ABO ou Rh pudessem predispor os eritrócitos a uma ação hemolítica maior, através de interação eletrostática com as enzimas do veneno.

Os experimentos que avaliaram a atividade de LiRecDT1 sobre eritrócitos de diferentes mamíferos sugerem o envolvimento de determinados esfingolipídeos no processo hemolítico desencadeado. Os eritrócitos mais susceptíveis à ação da toxina recombinante foram os que apresentavam maior quantidade de esfingomielina em suas membranas. Esses dados sugerem a participação do metabolismo da esfingomielina nos efeitos deletérios provocados pelo veneno de *L. intermedia* nos eritrócitos. Estes resultados associam o efeito hemolítico à ação das toxinas dermonecróticas, uma vez que estas toxinas são bioquimicamente classificadas como fosfolipases-D (PLD), devido a sua capacidade de hidrolisar lisoglicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios, que incluem a esfingomielina (Lee e Lynch, 2005). Recentemente, a ativação do metabolismo da esfingomielina, demonstrou desempenhar um papel importante em diversos processos biológicos, como cascatas de transdução de sinal envolvidas na proliferação celular,

diferenciação e apoptose (Gomez-Munoz, 2006; Eyster, 2007a; b; Arana, Gangoiti *et al.*, 2010; Gangoiti, Arana *et al.*, 2011). As análises morfológicas por microscopia de luz dos eritrócitos confirmaram nossos resultados que indicavam a ação direta do veneno e da toxina LiRecDT1 sobre essas células. As imagens obtidas sugerem que o diâmetro do eritrócito tratado seria menor que o do discócito, dados corroborados pela citometria de fluxo. Avaliações das características morfológicas através de citometria de fluxo mostraram alterações da forma normal dos eritrócitos, estes dados forneceram resultados mais quantitativos e representativos da ação do veneno e das toxinas sobre os eritrócitos. A microscopia eletrônica de varredura além de permitir a descrição e a distinção entre células espiculadas como acantócitos e esquizócitos, possibilitou a observação de células semelhantes à estomatócitos. A ausência de alterações nas células tratadas com LiRecDT1 H12A confirma a necessidade da atividade catalítica das toxinas dermonecróticas para a ação tóxica sobre eritrócitos. Como discutido anteriormente, nosso grupo mostrou que esta toxina mutada mantém a capacidade de ligação com moléculas da membrana eritrocitária (Chaim, Sade *et al.*, 2006; Chaim, Da Silveira *et al.*, 2011; Chaim, Trevisan-Silva *et al.*, 2011), portanto, as imagens aqui observadas sugerem que apenas a ligação das toxinas do tipo PLD à membrana eritrocitária não é suficientemente capaz de desencadear nenhum efeito sobre morfologia dos eritrócitos. Acreditamos que os metabólitos da ação da PLD loxoscélica sobre a membrana eritrocitária desempenham papel chave na atividade hemolítica direta do veneno de *L. intermedia*. Clinicamente, alterações nos componentes da membrana, lipídeos ou proteínas, podem resultar em mudanças na forma com conseqüente diminuição da resistência aos insultos metabólicos e mecânicos que estas células sofrem constantemente na circulação e aumento da destruição destas células (anemia hemolítica) (Hassoun e Palek, 1996)

Como discutido anteriormente, a ativação do metabolismo da esfingomielina desempenha um papel importante em diversos processos fisiopatológicos (Ochi, Miyawaki *et al.*, 2002; Ochi, Oda *et al.*, 2003; Oda, Matsuno *et al.*, 2008; Oda, Takahashi *et al.*, 2010). E isto ocorreria, principalmente, através da ação dos seus metabólitos a ceramida e a esfingosina-1-fosfato (S1P) (Hanel, Andreani *et al.*, 2007). A geração de ceramida é mediada pela hidrólise de esfingomielina, esta ceramida é deaminada à esfingosina por uma ceramidase e a esfingosina é fosforilada à esfingosina-1-fosfato (S1P) por uma esfingosina quinase, a ceramida

inicialmente produzida também pode ser convertida em ceramida-1-fosfato pela ceramida quinase (Chalfant, Szulc *et al.*, 2004; Pettus, Bielawska *et al.*, 2004; Pettus, Chalfant *et al.*, 2004; Chalfant e Spiegel, 2005; Lamour e Chalfant, 2005; Pettus, Kitatani *et al.*, 2005; Lamour e Chalfant, 2008; Lamour, Subramanian *et al.*, 2009). Todos os metabólitos acima descritos já foram relacionados com sinalização celular nos mais diversos processos biológicos, tanto fisiológicos quanto patológicos (Hait, Sarkar *et al.*, 2005; Maceyka, Sankala *et al.*, 2005; Saini, Coelho *et al.*, 2005; Sarkar, Maceyka *et al.*, 2005; Gomez-Munoz, 2006; Arana, Gangoiti *et al.*, 2010; Gangoiti, Arana *et al.*, 2011). Experimentos *in vitro* mostraram que as fosfolipases-D (PLD) loxoscélicas são capazes de hidrolisar lisoglicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios gerando ácido lisofosfatídico (LPA) e ceramida-1-fosfato (C1P) (Lee e Lynch, 2005). A ceramida-1-fosfato está envolvida em diversas respostas patológicas que incluem inflamação e agregação plaquetária (Anliker e Chun, 2004a; b), além de ser descrita como um segundo mensageiro na apoptose (Hannun e Luberto, 2004; Marchesini e Hannun, 2004; Hannun e Obeid, 2008). A geração do ácido lisofosfatídico (LPA) pelas PLDs loxoscélicas (Van Meeteren, Frederiks *et al.*, 2004) seria capaz de induzir diversas respostas biológicas pela sua ligação a receptores associados à proteína G (Anliker e Chun, 2004a; b). Recentemente, verificou-se que a PLD hidrolisa a lisofosfatidilcolina ou LPC (1-*o*-hexadecilglicero-3-fosfocolina), um importante componente plasmático, resultando neste importante mediador lipídico, o LPA (Van Meeteren, Frederiks *et al.*, 2004; Lee e Lynch, 2005). Sugerindo a participação do LPA proveniente da lise de LPC no quadro do envenenamento loxoscélico.

A análise ultraestrutural permitiu visualizar diversas alterações morfológicas, incluindo o a presença de microvesiculação na membrana dos eritrócitos tratados com veneno bruto e LiRecDT1. Este perfil de diminuição do volume celular e exovesiculação é uma característica observada quando o eritrócito sofre certos tipos injúria celular e exposição ao LPA (Yang, Andrews *et al.*, 2000; Lang, Kaiser *et al.*, 2003; Lang, Lang *et al.*, 2005; Lang, Kempe, Myssina *et al.*, 2005; Lang, Kempe, Tanneur *et al.*, 2005; Foller, Huber *et al.*, 2008). Essas alterações morfológicas já foram observadas após o tratamento de eritrócitos com várias concentrações de LPA (Chung, Bae *et al.*, 2007; Noh, Lim *et al.*, 2010). Segundo esse mesmo autor o tratamento com LPA induz o influxo de cálcio para dentro dos eritrócitos e esse é um mecanismo comum para microvesiculação e externalização de fosfatidilserina (PS).

Esse fenômeno, então, acarreta a formação de micro-partículas com PS expostas, aumentando a coagulação do sangue e a aderência à célula endotelial. Essa atividade trombogênica já foi observada em casos de coagulação intravascular disseminada (CIVD) e Anemia Falciforme (Chung, Bae *et al.*, 2007; Noh, Lim *et al.*, 2010).

Analisando estes dados podemos sugerir a participação do LPA, como metabólito da ação do veneno de *L. intermedia* sobre a membrana eritrocitária, no processo hemolítico direto provocado pelas toxinas PLD. Neste sentido, foi importante verificar a capacidade do tratamento com o veneno/LiRecDT1, que alterou a assimetria da membrana eritrocitária, evento que segue a ação do LPA sobre estas células.

Como discutido anteriormente LPA e S1P são conhecidos como indutores de várias respostas patológicas, incluindo inflamação e agregação plaquetária, aumento da permeabilidade vascular e da infiltração de neutrófilos (Yang, Andrews *et al.*, 2000; Anliker e Chun, 2004a; b; Van Meeteren, Frederiks *et al.*, 2004; Lee e Lynch, 2005; Tani, Ito *et al.*, 2007; Arana, Gangoiti *et al.*, 2010). Portanto, os dados até o momento obtidos sugerem um possível mecanismo de ação para o efeito hemolítico direto do veneno de *L. intermedia*: através da geração de mediadores lipídicos sobre a superfície dos eritrócitos, as fosfolipases-D presentes no veneno estimulariam danos na membrana destas células tornando-as mais propícias ao estresse fisiológico, induzindo à hemólise. Ou ainda, estes mediadores lipídicos poderiam desencadear uma sinalização intracelular que resultaria na lise celular.

Este mecanismo de hemólise sugerido, resultante da hidrólise da esfingomielina, é bastante similar ao processo fisiológico em que uma esfingomielinase neutra endógena é ativada e desencadeia um processo apoptótico, isto já foi observado para diferentes células incluindo os eritrócitos (Birbes, El Bawab *et al.*, 2001; Lang, Myssina *et al.*, 2004; Lang, Gulbins *et al.*, 2010). O metabolismo da esfingomielina originando ceramida poderia alterar as propriedades celulares globais, como por exemplo, alterações nos *Lipid rafts* e na fluidez da membrana desencadeando processos intracelulares (Huwiler, Kolter *et al.*, 2000; Huwiler, Johansen *et al.*, 2001). Os metabólitos da esfingomielina gerados pela ação de toxinas poderiam atuar em receptores da membrana do próprio eritrócito desencadeando uma sinalização intracelular, que culminaria no evento hemolítico.

Além disso, nossos resultados sugerem que apenas a ligação das toxinas à membrana celular não é suficiente para desencadear os efeitos tóxicos sobre os eritrócitos, existindo a necessidade da atividade do sítio catalítico destas enzimas, uma vez que a toxina mutada LiRecDT1 H12A, apesar não apresentar atividade catalítica é capaz de se ligar a diferentes lipídios da membrana (colesterol, esfingomiéline, lisoesfingolipídios) (Chaim, Da Silveira *et al.*, 2011). Portanto, a toxina LiRecDT1 H12A interage com a membrana do eritrócito sem ser capaz de induzir a hemólise.

O mecanismo de ação de uma fosfolipase-C, a α -toxina de *Clostridium perfringens* que induz hemólise em eritrócitos de carneiro e coelho sendo esta atividade relacionada com a ativação do metabolismo da esfingomiéline, especialmente com a formação de S1P (esfingosina-1-fosfato) já foi extensivamente estudada. Sabe-se que a atividade esfingomiélinásica desta toxina é essencial para seu efeito hemolítico e, portanto, eritrócitos com maior proporção de esfingomiéline na membrana apresentam maior taxa de hemólise (Ochi, Hashimoto *et al.*, 1996; Ochi, Miyawaki *et al.*, 2002; Ochi, Oda *et al.*, 2003; Oda, Matsuno *et al.*, 2008; Oda, Takahashi *et al.*, 2010). Avaliação sobre o mecanismo molecular pelo qual esta fosfolipase-C desencadeia o efeito hemolítico, já foi realizada e indica que está relacionada com o metabolismo da esfingomiéline, especialmente através da geração de S1P, mas estudos recentes mostram a participação de uma esfingomiélinase endógena no seu efeito hemolítico (Ochi, Hashimoto *et al.*, 1996; Ochi, Miyawaki *et al.*, 2002; Ochi, Oda *et al.*, 2003; Oda, Matsuno *et al.*, 2008; Oda, Takahashi *et al.*, 2010). Apesar de nossos estudos envolverem outra classe de fosfolipase, que diferem das fosfolipases-C no ponto de clivagem da esfingomiéline e nos produtos primários resultantes, este possível mecanismo também deve ser investigado, pois os produtos finais resultantes da ação destas enzimas têm sido reportados como os mesmos (LPA e S1P). E considerando esta possibilidade, poderíamos ter a participação de uma esfingomiélinase endógena, atuando sinergicamente à PLD loxoscélica, no evento hemolítico desencadeado pelo veneno de *L. intermedia*.

Um estudo recente indicou que LiRecDT1 liga esfingomiéline e colesterol, o que pode explicar como a toxina se liga a membranas de eritrócitos e corrobora a atividade hemolítica (Chaim, Da Silveira *et al.*, 2011; Chaim, Trevisan-Silva *et al.*, 2011). Essa informação também é reforçada pelos dados mostrados no Item 4, que

indicam a participação dos microdomínios lipídicos e em especial o colesterol como sítios de reconhecimentos para a fosfolipase-D de *L. intermedia*. A toxina PLD recombinante pode degradar membrana das células eritrócitos, devido à sua interação principalmente com esses microdomínios fosfolipídios.

No entanto, tem sido relatado que LiRecDT1, mas não LiRecDT1H12A, promove o influxo de cálcio em eritrócitos humanos de uma maneira dependente do tempo através de um canal de cálcio tipo L. Estas observações sugerem que o influxo de cálcio é devido à formação de mediadores lipídicos, tais como ceramida-1-fosfato ou seus metabólitos e ácido lisofosfatídico. A entrada de cálcio pode ativar várias cascatas de sinalização intracelular que podem desencadear a hemólise. Algumas vias de sinalização foram investigadas e aparentemente envolvem a participação dos receptores GPCR acoplados a proteína G (ativados pelo LPA, C1P e S1P), Fosfolipase A₂, Fosfolipase C e pelo metabolismo da esfingomielina em especial pela interconversão da C1P em ceramida.

Os resultados até o momento obtidos indicam fortemente que a fosfolipase-D interage especificamente com lipídios de membrana, especialmente com a esfingomielina. Porém, existem muitos pontos a serem esclarecidos sobre a atuação do veneno de *L. intermedia* e das toxinas dermonecróticas sobre os eritrócitos e no mecanismo do evento hemolítico, como a participação dos metabólitos da esfingomielina gerados pela ação das PLDs no desencadeamento dos processos celulares que irão gerar a hemólise. O presente trabalho mostrou a ação do veneno de *L. intermedia* e da toxina LiRecDT1 nos microdomínios lipídicos ricos em esfingolipídios e colesterol (*Lipid rafts*), uma vez que estas regiões da membrana têm sido reportadas como plataformas de sinalização intracelular (Huwiler, Kolter *et al.*, 2000; Huwiler, Johansen *et al.*, 2001). Os nossos resultados preliminares são extremamente promissores no sentido que além fornecem dados relevantes para a elucidação do mecanismo de ação do evento hemolítico provocado pelo veneno de *Loxosceles intermedia*, indicam fortemente quais são as toxinas presente no veneno as responsáveis por esta atividade, relacionando ainda a importância dos domínios estruturais da enzima para esta atividade.

Finalmente, consideramos que este estudo foi de grande relevância científica, pois acreditamos que essas informações continuarão abrindo novas hipóteses, que são essenciais para o aprofundamento no conhecimento do loxoscelismo, bem como para os nossos trabalhos futuros. Nosso objetivo maior é

buscar esclarecer os mecanismos moleculares da atividade hemolítica direta do veneno de *Loxosceles intermedia*, trazendo dados que possam ser úteis não só para o diagnóstico e tratamento dos acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles*, mas também possam evidenciar possíveis aplicações biotecnológicas para as toxinas recombinantes produzidas.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

- ✓ Através da tecnologia do DNA recombinante foi possível clonar, expressar e purificar na forma recombinante 6 isoformas de Fosfolipase-D presentes no veneno de *L. intermedia* (DT1, DT2, DT3, DT4, DT5 e DT6). Foi possível também clonar, expressar e purificar uma isoforma fluorescente (EGFP-DT1) e uma isoforma mutada no sítio catalítico (DT1-H12A) a partir da primeira isoforma encontrada no veneno de *L. intermedia*. Além disso, clonou-se a primeira isoforma de Fosfolipase A₂ presente nas cerdas de *L. obliqua*. Com perspectivas para promover a otimização da expressão e purificação na forma recombinante, para promover também sua caracterização bioquímica e biológica.
- ✓ Através de fluorimetria avaliou-se a atividade enzimática das toxinas recombinantes, constatou-se que elas apresentam diferentes atividades enzimáticas sobre esfingomielina e lisofosfatidilcolina, assim como sobre a membrana dos eritrócitos e extrato da membrana eritrocitária. Observou-se também que as fosfolipases-D recombinantes apresentam maior atividade enzimática sobre a esfingomielina.
- ✓ Observou-se a atividade hemolítica direta das toxinas recombinantes sobre eritrócitos humanos, que é diretamente proporcional a atividade enzimática dessas enzimas, a concentração e tempo de exposição à fosfolipase-D;
- ✓ Aparentemente os eritrócitos com maior porcentagem de esfingomielina na membrana plasmática, carneiro (50%), coelho (20%) e humano (18) são mais susceptíveis à ação da LiRecDT1, enquanto os eritrócitos de cavalo (14%) são muito menos susceptíveis à hemólise induzida pela toxina;
- ✓ Através de técnicas de microscopia e citometria de fluxo visualizou-se alterações morfológicas e redução do tamanho dos eritrócitos humanos expostos à LiRecDT1. Corroborou-se a injúria celular e dano tóxico sobre essas células, pela observação da exposição de fosfatidilserina, através da anexina V, e pela reorganização dos *lipid rafts*, através da toxina da cólera,

ambas induzidas pela LiRecDT1. Este dado são fortes marcadores de citotoxicidade e morte celular;

- ✓ Detectou-se a ligação ou interação das toxinas recombinantes sobre a membrana eritrocitária *in vitro*, utilizando a EGFP-LiRecDT1 que se confirmou através de imunofluorescência;
- ✓ Investigou-se a dependência da atividade catalítica das Fosfolipase-D nos efeitos tóxicos, utilizando uma toxina recombinante mutada LiRecDT1 H12A, com redução drástica na atividade catalítica. Através disso, pode-se constatar ausência de efeitos tóxicos após a incubação com doses 5 vezes maior da H12A, porém a capacidade de reconhecimento e ligação sobre a membrana foi preservada;
- ✓ Investigaram-se os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na atividade hemolítica dessas toxinas recombinantes. Observou-se que existe a participação do íon magnésio presente no sítio ativo da toxina, na atividade enzimática e hemolítica. Mostrou-se que os metabólitos gerados pela degradação da esfingomielina e lisofosfatidilcolina, desencadeiam hemólise. Detectou-se através de técnicas de fluorescência, utilizando o Fluo4-AM, a indução do influxo de Cálcio nos eritrócitos humanos após a incubação com a LiRecDT1. Observou-se também que a entrada de cálcio ocorria através dos canais de cálcio do Tipo-L, sensíveis à nifedipida e ao verapamil. Confirmou-se a participação dos metabólitos lipídicos gerados pela LiRecDT1 pela alterações dos receptores “GPCRs”. Observou-se a ativação de cascatas intracelulares, através de enzimas endógenas como a PLA₂, COX, PLC e fosfatase lipídica que promovem a formação de moléculas efetoras que promoveram a morte e ruptura dos eritrócitos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Alberts, B., A. Johnson, et al. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York:, Garland Science.
- Álvares, É. S. S., T. Rodrigues, et al. (2004). "On *Loxosceles anomala* (MELLO-LEITÃO) (ARANEAE: SICARIIDAE)." Revista Ibérica de Aracnología 10: 293–295.
- Alvarez-Flores, M. P., D. Furlin, et al. (2010). "Losac, the first hemolin that exhibits procogulant activity through selective factor X proteolytic activation." J Biol Chem 286(9): 6918-6928.
- Alvarez, C., J. M. Mancheno, et al. (2009). "Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes." Toxicon 54(8): 1135-1147.
- Alvarez Flores, M. P., M. Fritzen, et al. (2006). "Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival." Biochem Biophys Res Commun 343(4): 1216-1223.
- Alvarez Flores, M. P., M. Zannin, et al. (2011). "New insight into the mechanism of *Lonomia obliqua* envenoming: toxin involvement and molecular approach." Pathophysiol Haemost Thromb 37(1): 1-16.
- Amarant, T., W. Burkhart, et al. (1991). "Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic Saturnid caterpillar *Lonomia achelous*." Biochim Biophys Acta 1079(2): 214-221.
- Aminoff, D., W. F. Bruegge, et al. (1977). "Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: interaction of neuraminidase-treated and

- untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level." Proc Natl Acad Sci U S A 74(4): 1521-1524.
- Anliker, B. and J. Chun (2004). "Cell surface receptors in lysophospholipid signaling." Semin Cell Dev Biol 15(5): 457-465.
- Anliker, B. and J. Chun (2004). "Lysophospholipid G protein-coupled receptors." J Biol Chem 279(20): 20555-20558.
- Appel, M. H., R. B. da Silveira, et al. (2008). "Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom." Biochim Biophys Acta 1780(2): 167-178.
- Arana, L., P. Gangoiti, et al. (2010). "Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease." Lipids Health Dis 9: 15.
- Arlian, L. G. (2002). "Arthropod allergens and human health." Annu Rev Entomol 47: 395-433.
- Arni, R. K. and R. J. Ward (1996). "Phospholipase A2: a structural review." Toxicon 34(8): 827-841.
- Arocha-Pinango, C. L. and B. Guerrero (1999). "Lonomia obliqua and haemorrhagic syndrome." Lancet 354(9186): 1304.
- Arocha-Pinango, C. L. and B. Guerrero (2001). "Lonomia genus caterpillar envenomation: clinical and biological aspects." Haemostasis 31(3-6): 288-293.
- Arocha-Pinango, C. L. and B. Guerrero (2003). "Hemorrhagic syndrome induced by caterpillars. Clinical and experimental studies." Invest Clin 44(2): 155-163.
- Arocha-Pinango, C. L., E. Marval, et al. (2000). "Lonomia genus caterpillar toxins: biochemical aspects." Biochimie 82(9-10): 937-942.

- Balit, C. R., M. J. Geary, et al. (2003). "Prospective study of definite caterpillar exposures." Toxicon 42(6): 657-662.
- Barbaro, K. C., J. L. Cardoso, et al. (1992). "Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom." Toxicon 30(3): 331-338.
- Barbaro, K. C., V. R. Eickstedt, et al. (1994). "Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom." Toxicon 32(6): 687-693.
- Barreto, O. C. O., J. L. C. Cardoso, et al. (1985). "Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency." Rev Inst Med Trop São Paulo 27: 264-267.
- Basualdo, A., K. C. de Oliveira, et al. (2008). "Tratamento clínico e bucomaxilofacial de quadro hemorrágico-alérgico por *Lonomia* sp: relato de caso." Stomatol 14(26): 46-54.
- Battisti, A., G. Holm, et al. (2011). "Urticating hairs in arthropods: their nature and medical significance." Annu Rev Entomol 56: 203-220.
- Berdyshev, E. V., I. Gorshkova, et al. (2011). "Intracellular S1P generation is essential for S1P-induced motility of human lung endothelial cells: role of sphingosine kinase 1 and S1P lyase." PLoS One 6(1): e16571.
- Berger, M., J. Reck, Jr., et al. (2010). "*Lonomia obliqua* caterpillar envenomation causes platelet hypoaggregation and blood incoagulability in rats." Toxicon 55(1): 33-44.
- Berger, M., J. J. Reck, et al. (2010). "*Lonomia obliqua* venomous secretion induces human platelet adhesion and aggregation." J Thromb Thrombolysis 30(3): 300-310.

- Binford, G. J. and M. A. Wells (2003). "The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogygne spiders." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 135(1): 25-33.
- Birbes, H., S. El Bawab, et al. (2001). "Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis." FASEB J 15(14): 2669-2679.
- Boath, A., C. Graf, et al. (2008). "Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin." J Biol Chem 283(13): 8517-8526.
- Bornancin, F. (2011). "Ceramide kinase: the first decade." Cell Signal 23(6): 999-1008.
- Bravo, L. M., S. O. Puratic, et al. (1993). "Estudio de la hemólisis inducida por veneno de *L. laeta*. Experiência *in vitro*." Rev. Med. Chile. 121: 16-20.
- Bucarechi, F., E. M. De Capitani, et al. (2010). "Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles anomala*." Clin Toxicol (Phila) 48(7): 764-765.
- Cabrerizo, S., P. C. Docampo, et al. (2009). "Loxoscelism: epidemiology and clinical aspects of an endemic pathology in the country." Arch Argent Pediatr 107(2): 152-159.
- Calder, P. C. and P. Yaqoob (2007). "Lipid rafts--composition, characterization, and controversies." J Nutr 137(3): 545-547.
- Caovilla, J. J. and E. J. Barros (2004). "Efficacy of two different doses of antilonomic serum in the resolution of hemorrhagic syndrome resulting from envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars: a randomized controlled trial." Toxicon 43(7): 811-818.
- Cardoso, J. L. C. and D. M. De Cillo (1990). "Primeiro diagnóstico de "loxoscelismo" na casuística do Hospital Vital Brazil (HVB). ." Mem Inst Butantan. 52(81).

- Cardoso, J. L. C., F. O. S. França, et al. (2003). Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo, Sarvier.
- Chaim, O. M., R. B. da Silveira, et al. (2011). "Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity." Biochim Biophys Acta 1811(2): 84-96.
- Chaim, O. M., Y. B. Sade, et al. (2006). "Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity." Toxicol Appl Pharmacol 211(1): 64-77.
- Chaim, O. M., D. Trevisan-Silva, et al. (2011). "Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes." Toxins 3 309-344.
- Chalfant, C. E. and S. Spiegel (2005). "Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling." J Cell Sci 118(Pt 20): 4605-4612.
- Chalfant, C. E., Z. Szulc, et al. (2004). "The structural requirements for ceramide activation of serine-threonine protein phosphatases." J Lipid Res 45(3): 496-506.
- Chaves-Moreira, D., L. M. Alvarenga, et al. (2011). "Hemolytic activity of toxins from venomous animals: an overview." Toxicon.
- Chaves-Moreira, D., O. M. Chaim, et al. (2009). "Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom." J Cell Biochem 107(4): 655-666.
- Chaves-Moreira, D., F. N. Souza, et al. (2011). "The relationship between Calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin." J Cell Biochem.

- Choi, J. W., D. R. Herr, et al. (2010). "LPA receptors: subtypes and biological actions." Annu Rev Pharmacol Toxicol 50: 157-186.
- Chomczynski, P. (1993). "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." Biotechniques 15(3): 532-534, 536-537.
- Christie, W. W. and X. Han (2010). Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis. Bridgwater, U.K.
- Chudzinski-Tavassi, A. M. and M. P. Alvarez Flores (2005). "Exploring new molecules and activities from *Lonomia obliqua* caterpillars." Pathophysiol Haemost Thromb 34(4-5): 228-233.
- Chun, J., T. Hla, et al. (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature." Pharmacol Rev 62(4): 579-587.
- Chung, S. M., O. N. Bae, et al. (2007). "Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes." Arterioscler Thromb Vasc Biol 27(2): 414-421.
- Corrêa, M. S., R. Siqueira-Batista, et al. (2004). "Erucismo por *Lonomia* spp em Teresópolis, RJ, Brasil. Relato de um caso provável e revisão da literatura." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 37(5): 418-421.
- Cotrim, C. A., S. C. de Oliveira, et al. (2011). "Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2." Chem Biol Interact 189(1-2): 9-16.
- Cramer, K. (2009). Tree of Life Web Project. 24.

- Cunha, R. B., K. C. Barbaro, et al. (2003). "Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom." J Protein Chem 22(2): 135-146.
- da Silva, G. H., S. Hyslop, et al. (2004). "Lonomia obliqua caterpillar venom increases permeability of the blood-brain barrier in rats." Toxicon 44(6): 625-634.
- da Silva, P. H., R. B. da Silveira, et al. (2004). "Brown spiders and loxoscelism." Toxicon 44(7): 693-709.
- da Silva, W. D., C. M. Campos, et al. (1996). "Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars." Toxicon 34(9): 1045-1049.
- da Silveira, R. B., O. M. Chaim, et al. (2007). "Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases." Toxicon 49(6): 758-768.
- da Silveira, R. B., J. F. dos Santos Filho, et al. (2002). "Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders." Toxicon 40(6): 815-822.
- da Silveira, R. B., R. B. Pigozzo, et al. (2006). "Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland." Biochimie 88(9): 1241-1253.
- da Silveira, R. B., R. B. Pigozzo, et al. (2007). "Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization." Biochimie 89(3): 289-300.
- da Silveira, R. B., A. C. Wille, et al. (2007). "Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom." Biochem J 406(2): 355-363.

- Daher, E. F., G. B. da Silva Junior, et al. (2003). "Acute renal failure after massive honeybee stings." Rev Inst Med Trop Sao Paulo 45(1): 45-50.
- de Andrade, S. A., M. T. Murakami, et al. (2006). "Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom." Toxicon 47(4): 380-386.
- de Andrade, S. A., M. F. Pedrosa, et al. (2005). "Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism." Biochem Biophys Res Commun 327(1): 117-123.
- de Castro, C. S., F. G. Silvestre, et al. (2004). "Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*." Toxicon 44(3): 273-280.
- de Giuseppe, P. O., A. Ullah, et al. (2011). "Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge." Biochem Biophys Res Commun 409(4): 622-627.
- de Paula, R. C., H. C. Castro, et al. (2009). "Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms." Protein Pept Lett 16(8): 899-907.
- de Roodt, A. R., O. D. Salomon, et al. (2002). "Poisoning by spiders of *Loxosceles* genus." Medicina (B Aires) 62(1): 83-94.
- de Souza, A. L., C. M. Malaque, et al. (2008). "*Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury." Toxicon 51(1): 151-156.
- Denny, W. F., C. J. Dillaha, et al. (1964). "Hemotoxic Effect of *Loxosceles Reclusus* Venom: In Vivo and in Vitro Studies." J Lab Clin Med 64: 291-298.
- Diaz, J. H. (2005). "The epidemiology, diagnosis, and management of caterpillar envenoming in the southern US." J La State Med Soc 157(3): 153-157.

- Diaz, J. H. (2005). "The evolving global epidemiology, syndromic classification, management, and prevention of caterpillar envenoming." Am J Trop Med Hyg 72(3): 347-357.
- Donato, J. L., R. A. Moreno, et al. (1998). "Lonomia obliqua caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin." Thromb Haemost 79(3): 539-542.
- dos Santo, V. L., C. R. Franco, et al. (2000). "Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider)." Toxicon 38(2): 265-285.
- Duncan, R. P., M. R. Rynerson, et al. (2010). "Diversity of *Loxosceles* spiders in Northwestern Africa and molecular support for cryptic species in the *Loxosceles rufescens* lineage." Mol Phylogenet Evol 55(1): 234-248.
- Durocher, J. R., R. C. Payne, et al. (1975). "Role of sialic acid in erythrocyte survival." Blood 45(1): 11-20.
- Erman, A., R. Azuri, et al. (1983). "Phospholipase A2 inhibitors. Differential inhibition of fatty acid acylation into kidney lipids by mepacrine and p-bromophenacyl bromide." Biochem Pharmacol 32(13): 2083-2087.
- Escoubas, P., S. Diochot, et al. (2000). "Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins." Biochimie 82(9-10): 893-907.
- Espindula, A. P., M. L. d. F. Ferraz, et al. (2009). "Acidente Humano Por Leptópteros." Revista de Patologia Tropical 38(1): 63-66.
- Eyster, K. M. (2007). "The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist." Adv Physiol Educ 31(1): 5-16.

- Eyster, K. M. (2007). "New paradigms in signal transduction." Biochem Pharmacol 73(10): 1511-1519.
- Fairbanks, G., T. L. Steck, et al. (1971). "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane." Biochemistry 10(13): 2606-2617.
- Feitosa, L., W. Gremski, et al. (1998). "Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom." Toxicon 36(7): 1039-1051.
- Ferrer, V. P. (2010). Clonagem e Expressão Heteróloga de Hialuronidase e Alérgeno presentes no veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*). Biologia Celular e Molecular. Curitiba, Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná: 102.
- Fischer, M. L. (2007). "Comportamento sexual de *Loxosceles laeta* (Nicolet) (Araneae, Sicariidae): influência da idade da fêmea." Revista Brasileira de Zoologia 24(4): 865-872.
- Fischer, M. L. (2008). "Descrição do comportamento agonístico de *Loxosceles laeta*, *L. hirsuta* e *L. intermedia* (Araneae: Sicariidae)." Revista Brasileira de Zoologia 25(4): 579-586.
- Fischer, M. L., S. Bazilio, et al. (2009). "Diagnóstico da ocorrência de aranhas do gênero *Loxosceles* Heineken e Lowe, 1832 (Araneae, Sicariidae) no município de União da Vitória, Paraná." Biotemas 22 (1): 155-159.
- Fischer, M. L. and J. Vasconcellos-Neto (2005). "Parameters affecting fecundity of *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão 1934 (ARANEAE, SICARIIDAE)." Journal of Arachnology 33: 670-680.

- Foller, M., S. M. Huber, et al. (2008). "Erythrocyte programmed cell death." IUBMB Life 60(10): 661-668.
- Foller, M., M. Sopjani, et al. (2009). "Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase." FASEB J 23(4): 1072-1080.
- Furlanetto, R. S. (1961). Estudos sobre a preparação do soro antiloxoscélico. Faculdade de Farmácia e Odontologia. São Paulo, Universidade de São Paulo. Doutorado.
- Futrell, J. M. (1992). "Loxoscelism." Am J Med Sci 304(4): 261-267.
- Gamborgi, G. P., E. B. Metcalf, et al. (2006). "Acute renal failure provoked by toxin from caterpillars of the species *Lonomia obliqua*." Toxicon 47(1): 68-74.
- Gangoiti, P., L. Arana, et al. (2011). "Activation of mTOR and RhoA is a major mechanism by which Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation." Cell Signal 23(1): 27-34.
- Gattegno, L., D. Bladier, et al. (1974). "The role of sialic acid in the determination of survival of rabbit erythrocytes in the circulation." Carbohydr Res 34(2): 361-369.
- Geren, C. R., T. K. Chan, et al. (1976). "Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*)." Arch Biochem Biophys 174(1): 90-99.
- Gertsch, W. (1967). "The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae)." Bulletin of American Museum of Natural History 136: 117-178.
- Gibly, R. L., F. G. Walter, et al. (1998). "Intravascular hemolysis associated with North American crotalid envenomation." J Toxicol Clin Toxicol 36(4): 337-343.
- Gomez-Munoz, A. (2006). "Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death." Biochim Biophys Acta 1758(12): 2049-2056.

- Gonçalves de Andrade, R. M., K. C. De Oliveira, et al. (1999). "Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom." Toxicon 37(4): 627-632.
- Gremski, L. H., R. B. da Silveira, et al. (2010). "A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis." Mol Biosyst 6(12): 2403-2416.
- Hait, N. C., S. Sarkar, et al. (2005). "Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor." J Biol Chem 280(33): 29462-29469.
- Hanel, P., P. Andreani, et al. (2007). "Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood." FASEB J 21(4): 1202-1209.
- Hannun, Y. A. and C. Luberto (2004). "Lipid metabolism: ceramide transfer protein adds a new dimension." Curr Biol 14(4): R163-165.
- Hannun, Y. A. and L. M. Obeid (2008). "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids." Nat Rev Mol Cell Biol 9(2): 139-150.
- Hariprasad, G., M. Kumar, et al. (2011). "Structural analysis of a group III Glu62-phospholipase A2 from the scorpion, *Mesobuthus tamulus*: Targeting and reversible inhibition by native peptides." Int J Biol Macromol 48(3): 423-431.
- Harris, F. and D. A. Phoenix (1997). "An investigation into the ability of C-terminal homologues of *Escherichia coli* low molecular mass penicillin-binding proteins 4, 5 and 6 to undergo membrane interaction." Biochimie 79: 171-174.
- Haseruck, N., W. Erl, et al. (2004). "The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors." Blood 103(7): 2585-2592.
- Hassoun, H. and J. Palek (1996). "Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease." Blood Rev 10(3): 129-147.

- Hinkovska-Galcheva, V., A. Clark, et al. (2008). "Ceramide kinase promotes Ca²⁺ signaling near IgG-opsonized targets and enhances phagolysosomal fusion in COS-1 cells." J Lipid Res 49(3): 531-542.
- Hinkovska-Galcheva, V., S. M. VanWay, et al. (2008). "The role of sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate in calcium homeostasis." Curr Opin Investig Drugs 9(11): 1192-1205.
- Hoffman, D. R. (2008). "Structural biology of allergens from stinging and biting insects." Curr Opin Allergy Clin Immunol 8(4): 338-342.
- Hogan, C. J., K. C. Barbaro, et al. (2004). "Loxoscelism: old obstacles, new directions." Ann Emerg Med 44(6): 608-624.
- Hossler, E. W. (2009). "Caterpillars and moths." Dermatol Ther 22(4): 353-366.
- Huwiler, A., B. Johansen, et al. (2001). "Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release." FASEB J 15(1): 7-9.
- Huwiler, A., T. Kolter, et al. (2000). "Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling." Biochim Biophys Acta 1485(2-3): 63-99.
- Inagaki, H., Y. Yamauchi, et al. (2010). "Regional divergence of phospholipase A(2)-like protein cDNAs between New Guinean and Australian *Pseudechis australis*." Toxicon 56(4): 637-639.
- Isbister, G. K. and M. R. Gray (2002). "A prospective study of 750 definite spider bites, with expert spider identification." QJM 95(11): 723-731.
- Jain, M. K. and O. G. Berg (2006). "Coupling of the i-face and the active site of phospholipase A2 for interfacial activation." Curr Opin Chem Biol 10(5): 473-479.

- Kalapothakis, E., M. Chatzaki, et al. (2007). "The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom." Toxicon 50(7): 938-946.
- Kalfa, T. A., S. Pushkaran, et al. (2006). "Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton." Blood 108: 3637-3645.
- Kamata, K., S. Manno, et al. (2008). "Functional evidence for presence of lipid rafts in erythrocyte membranes: Gsalpha in rafts is essential for signal transduction." Am J Hematol 83(5): 371-375.
- Kilsdonk, E. P., P. G. Yancey, et al. (1995). "Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins." J Biol Chem 270(29): 17250-17256.
- Kini, R. M. (2003). "Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes." Toxicon 42(8): 827-840.
- Kitatani, K., J. Idkowiak-Baldys, et al. (2008). "The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling." Cell Signal 20(6): 1010-1018.
- Kobayashi, N., A. Yamaguchi, et al. (2009). "Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1-phosphate transporter in rat erythrocytes." J Biol Chem 284(32): 21192-21200.
- Kohler, G. A., A. Brenot, et al. (2006). "Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi." Biochim Biophys Acta 1761(11): 1391-1399.
- Koshino, I. and Y. Takakuwa (2009). "Disruption of lipid rafts by lidocaine inhibits erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*." Exp Parasitol 123(4): 381-383.
- Kuipers, O. P., P. A. Franken, et al. (1990). "Function of the fully conserved residues Asp99, Tyr52 and Tyr73 in phospholipase A2." Protein Eng 4(2): 199-204.

- Kuipers, O. P., J. Kerver, et al. (1990). "Influence of size and polarity of residue 31 in porcine pancreatic phospholipase A2 on catalytic properties." Protein Eng 3(7): 599-603.
- Kuipers, O. P., C. J. van den Bergh, et al. (1990). "Probing the mechanism of pancreatic phospholipase A2 with the aid of recombinant DNA techniques." Adv Exp Med Biol 279: 65-84.
- Kusma, J., O. M. Chaim, et al. (2008). "Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity." Biochimie 90(11-12): 1722-1736.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Lambeau, G. and M. H. Gelb (2008). "Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2." Annu Rev Biochem 77: 495-520.
- Lamour, N. F. and C. E. Chalfant (2005). "Ceramide-1-phosphate: the "missing" link in eicosanoid biosynthesis and inflammation." Mol Interv 5(6): 358-367.
- Lamour, N. F. and C. E. Chalfant (2008). "Ceramide kinase and the ceramide-1-phosphate/cPLA2alpha interaction as a therapeutic target." Curr Drug Targets 9(8): 674-682.
- Lamour, N. F., P. Subramanian, et al. (2009). "Ceramide 1-phosphate is required for the translocation of group IVA cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin synthesis." J Biol Chem 284(39): 26897-26907.
- Lamy, M., M. H. Pastureaud, et al. (1986). "Thaumetopoein: an urticating protein from the hairs and integument of the pine processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff., Lepidoptera, Thaumetopoeidae)." Toxicon 24(4): 347-356.

- Lang, F., E. Gulbins, et al. (2010). "Ceramide in suicidal death of erythrocytes." Cell Physiol Biochem 26(1): 21-28.
- Lang, K. S., P. A. Lang, et al. (2005). "Mechanisms of suicidal erythrocyte death." Cell Physiol Biochem 15(5): 195-202.
- Lang, K. S., S. Myssina, et al. (2004). "Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes." Cell Death Differ 11(2): 231-243.
- Lang, P. A., J. Huober, et al. (2006). "Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel." Cell Physiol Biochem 18(1-3): 151-164.
- Lang, P. A., S. Kaiser, et al. (2003). "Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis." Am J Physiol Cell Physiol 285(6): C1553-1560.
- Lang, P. A., D. S. Kempe, et al. (2005). "PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death." Cell Death Differ 12(5): 415-428.
- Lang, P. A., D. S. Kempe, et al. (2005). "Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor." J Cell Sci 118(Pt 6): 1233-1243.
- Lee, J. Y. and C. J. Kim (2010). "Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits type I-IV allergic inflammation and pro-inflammatory enzymes." Arch Pharm Res 33(6): 947-957.
- Lee, S. and K. R. Lynch (2005). "Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA)." Biochem J 391(Pt 2): 317-323.
- Levi, M., E. de Jonge, et al. (2002). "The diagnosis of disseminated intravascular coagulation." Blood Rev 16(4): 217-223.
- Lorini, L. M. and É. Corseuil (2001). "Aspectos morfológicos de *Lononia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) em laboratório." Neotrop. Entomol. 30: 373-378.

- Losher, D. (2009). "A brown recluse spider bite." Dermatol Nurs 21(6): 360-361.
- Luciano, M. N., P. H. da Silva, et al. (2004). "Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue." J Histochem Cytochem 52(4): 455-467.
- Lung, J. M. and S. B. Mallory (2000). "A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge." Int J Dermatol 39(4): 287-289.
- Maceyka, M., H. Sankala, et al. (2005). "SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism." J Biol Chem 280(44): 37118-37129.
- Machado, L. F., S. Laugesen, et al. (2005). "Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom." Proteomics 5(8): 2167-2176.
- Maier, H., W. Spiegel, et al. (2003). "The oak processionary caterpillar as the cause of an epidemic airborne disease: survey and analysis." Br J Dermatol 149(5): 990-997.
- Malaque, C. M., L. Andrade, et al. (2006). "Short report: A case of hemolysis resulting from contact with a *Lonomia* caterpillar in southern Brazil." Am J Trop Med Hyg 74(5): 807-809.
- Marchesini, N. and Y. A. Hannun (2004). "Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation." Biochem Cell Biol 82(1): 27-44.
- Marchi-Salvador, D. P., L. B. Silveira, et al. (2005). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A2 from *Bothrops moojeni*." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 61(Pt 10): 882-884.

- Marchioro, C., M. L. Fischer, et al. (2004). "Desenvolvimento pós-embrionário de *Loxosceles intermedia* Mello-Leitão, 1934; *L. laeta* (Nicolet, 1832) e *L. gaucho* Gertsch, 1964 (Araneae; Sicariidae) criadas sob condições de alimentação monoespecíficas. ." Biotemas 18(1).
- Marques-da-Silva, E. (2002). Loxoscelismo no Estado do Paraná: análise epidemiológica dos acidentes causados por *Loxosceles Heinecken & Lowe*, 1832, no período de 1993 a 2000. Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública. . São Paulo, Fundação Oswaldo Cruz.
- Marques-da-Silva, E. and M. L. Fischer (2000). "Occurrence of species of the genus *Loxosceles* Heinecken & Lowe, 1832 (Araneae: Sicariidae) in the Paraná State." Anais da Reunião Científica Annual do Instituto Butantan.: 51.
- Marques-da-Silva, E. and M. L. Fischer (2005). "Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heinecken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38(4): 331-335.
- Martins, R. D., R. S. Alves, et al. (2009). "Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A(2) from sea anemone *Bunodosoma caissarum*." Toxicon 54(4): 413-420.
- Mello-Leitão, C. F. D. (1917). "Especies novas ou pouco conhecidas do Brasil. ." Broteria 15: 74-102.
- Ministério-da-Saúde (2001). "Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos." Fundação Nacional da Saúde 2: 45-58.
- Mogami, H., C. Lloyd Mills, et al. (1997). "Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca²⁺, potentiates Ins(1,4,5)P₃-mediated Ca²⁺ release

and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells." Biochem J 324 (Pt 2): 645-651.

Monteiro, C. L., R. Rubel, et al. (2002). "Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism." Toxicon 40(4): 409-418.

Monteiro, M. C., P. R. Romao, et al. (2009). "Pharmacological perspectives of wasp venom." Protein Pept Lett 16(8): 944-952.

Montes, L. R., D. J. Lopez, et al. (2008). "Ceramide-enriched membrane domains in red blood cells and the mechanism of sphingomyelinase-induced hot-cold hemolysis." Biochemistry 47(43): 11222-11230.

Murakami, M., H. Ito, et al. (2011). "Sphingosine Kinase 1/S1P Pathway Involvement in the GDNF-Induced GAP43 Transcription." J Cell Biochem.

Murakami, M. T., M. F. Fernandes-Pedrosa, et al. (2006). "Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases." Biochem Biophys Res Commun 342(1): 323-329.

Murakami, M. T., M. F. Fernandes-Pedrosa, et al. (2005). "Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D." J Biol Chem 280(14): 13658-13664.

Muto, Y., T. Nagao, et al. (1997). "The putative phospholipase C inhibitor U73122 and its negative control, U73343, elicit unexpected effects on the rabbit parietal cell." J Pharmacol Exp Ther 282(3): 1379-1388.

- Noh, J. Y., K. M. Lim, et al. (2010). "Procoagulant and prothrombotic activation of human erythrocytes by phosphatidic acid." Am J Physiol Heart Circ Physiol 299(2): H347-355.
- Ochi, S., K. Hashimoto, et al. (1996). "Phospholipid metabolism induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin elicits a hot-cold type of hemolysis in rabbit erythrocytes." Infect Immun 64(9): 3930-3933.
- Ochi, S., T. Miyawaki, et al. (2002). "Clostridium perfringens alpha-toxin induces rabbit neutrophil adhesion." Microbiology 148(Pt 1): 237-245.
- Ochi, S., M. Oda, et al. (2003). "Clostridium perfringens alpha-toxin-induced hemolysis of horse erythrocytes is dependent on Ca²⁺ uptake." Biochim Biophys Acta 1613(1-2): 79-86.
- Oda, M., S. Ikari, et al. (2006). "Signal transduction mechanism involved in Clostridium perfringens alpha-toxin-induced superoxide anion generation in rabbit neutrophils." Infect Immun 74(5): 2876-2886.
- Oda, M., T. Matsuno, et al. (2008). "The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by Clostridium perfringens alpha-toxin." J Lipid Res 49(5): 1039-1047.
- Oda, M., M. Takahashi, et al. (2010). "Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase." Biochim Biophys Acta 1798(6): 1073-1080.
- Ouyang, Y. and N. E. Kaminski (1999). "Phospholipase A2 inhibitors p-bromophenacyl bromide and arachidonyl trifluoromethyl ketone suppressed interleukin-2 (IL-2) expression in murine primary splenocytes." Arch Toxicol 73(1): 1-6.

- Paludo, K. S., S. M. Biscaia, et al. (2009). "Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 149(3): 323-333.
- Pauli, I., J. C. Minozzo, et al. (2009). "Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*)." Toxicon 53(6): 660-671.
- Pauli, I., J. Puka, et al. (2006). "The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment." Toxicon 48(2): 123-137.
- Pernet, C., M. Dandurand, et al. (2010). "Necrotic arachnidism in the south of France: two clinical cases of loxoscelism." Ann Dermatol Venereol 137(12): 808-812.
- Peterson, M. E. (2006). "Brown spider envenomation." Clin Tech Small Anim Pract 21(4): 191-193.
- Pettus, B. J., A. Bielawska, et al. (2004). "Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2." J Biol Chem 279(12): 11320-11326.
- Pettus, B. J., C. E. Chalfant, et al. (2004). "Sphingolipids in inflammation: roles and implications." Curr Mol Med 4(4): 405-418.
- Pettus, B. J., K. Kitatani, et al. (2005). "The coordination of prostaglandin E2 production by sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate." Mol Pharmacol 68(2): 330-335.
- Pinto, A. F., M. Berger, et al. (2010). "Lonomia obliqua venom: In vivo effects and molecular aspects associated with the hemorrhagic syndrome." Toxicon 56(7): 1103-1112.
- Platnick, N. I. (2011). The World Spider Catalog, Version 12.0, The American Museum of Natural History.

- Radvanyi, F. R. and C. Bon (1982). "Catalytic activity and reactivity with p-bromophenacyl bromide of the phospholipase subunit of crotoxin. Influence of dimerization and association with the noncatalytic subunit." J Biol Chem 257(21): 12616-12623.
- Ramos, J. D., N. Cheong, et al. (2001). "cDNA cloning and expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin." Int Arch Allergy Immunol 126(4): 286-293.
- Rees, R. S., L. B. Nanney, et al. (1984). "Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: the inciting mechanism?" J Invest Dermatol 83(4): 270-275.
- Reis, C. V., S. A. Andrade, et al. (2006). "Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure-function insights." Biochem J 398(2): 295-302.
- Reis, C. V., F. Faria, et al. (2005). "Gene expression in the bristles from *Lonomia obliqua* caterpillar through the generation of Expressed Sequence Tags (ESTs)." Unpublished.
- Reis, C. V., S. H. Farsky, et al. (2001). "In vivo characterization of Lopap, a prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom." Thromb Res 102(5): 437-443.
- Reis, C. V., E. M. Kelen, et al. (1999). "A Ca^{++} activated serine protease (LOPAP) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. *L. obliqua* Prothrombin Activator Protease." Lancet 353(9168): 1942.

- Reis, C. V., F. C. Portaro, et al. (2001). "A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap) biochemical characterization." Thromb Res 102(5): 427-436.
- Ribeiro, L. A., V. R. Von Eickstedt, et al. (1993). "Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles*. Heineken & Lowe no estado do Paraná (Brasil)." Mem Inst Butantan. 55: 19-26.
- Ribeiro, R. O., O. M. Chaim, et al. (2007). "Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom." Toxicon 50(8): 1162-1174.
- Rinaldi, I. M. P. and A. A. Stropa (1998). "Sexual behaviour in *Loxosceles gaucha* Gertsch 1967 (Araneae; Sicariidae)." Bulletin of the British Arachnological Society 11: 57-61.
- Roberts, M. F. (1996). "Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface." FASEB J 10(10): 1159-1172.
- Rubio, G. B. (2001). "Epidemiological surveillance of distribution of the caterpillar *Lonomia obliqua* Walker, 1855, in the State of Parana, Brazil." Cad Saude Publica 17(4): 1036.
- Sade, Y. B. (2009). Clonagem, expressão e purificação de uma proteína da superfamília TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) a partir de biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*). Biologia Celular e Molecular. Curitiba, Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná: 90.
- Saini, H. S., R. P. Coelho, et al. (2005). "Novel role of sphingosine kinase 1 as a mediator of neurotrophin-3 action in oligodendrocyte progenitors." J Neurochem 95(5): 1298-1310.

- Sakurai, J., M. Nagahama, et al. (2004). "Clostridium perfringens alpha-toxin: characterization and mode of action." J Biochem 136(5): 569-574.
- Sambrook, J. and D. W. Russel (2001). Molecular cloning, a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampaio, S. C., S. Hyslop, et al. (2010). "Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin." Toxicon 55(6): 1045-1060.
- Sams, H. H., C. A. Dunnick, et al. (2001). "Necrotic arachnidism." J Am Acad Dermatol 44(4): 561-573; quiz 573-566.
- Sarikaya, Y. (2011). Vector bugs and animals, Shutterstock.com
- Sarkar, S., M. Maceyka, et al. (2005). "Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells." FEBS Lett 579(24): 5313-5317.
- Saupe, E. E., M. Papes, et al. (2011). "Tracking a medically important spider: climate change, ecological niche modeling, and the brown recluse (*Loxosceles reclusa*)." PLoS One 6(3): e17731.
- Scott, D. L., Z. Otwinowski, et al. (1990). "Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue." Science 250(4987): 1563-1566.
- Scott, D. L., S. P. White, et al. (1990). "Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2." Science 250(4987): 1541-1546.
- Seibert, C. S., M. R. Oliveira, et al. (2004). "Intravascular hemolysis induced by *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract: an experimental model of envenomation in rats." Toxicon 44(7): 793-799.

- Seibert, C. S., M. L. Santoro, et al. (2010). "Lonomia obliqua (Lepidoptera, Saturniidae) caterpillar bristle extract induces direct lysis by cleaving erythrocyte membrane glycoproteins." Toxicon 55(7): 1323-1330.
- Seibert, C. S., E. M. Shinohara, et al. (2003). "In vitro hemolytic activity of Lonomia obliqua caterpillar bristle extract on human and Wistar rat erythrocytes." Toxicon 41(7): 831-839.
- Seibert, C. S., A. M. Tanaka-Azevedo, et al. (2006). "Purification of a phospholipase A2 from Lonomia obliqua caterpillar bristle extract." Biochem Biophys Res Commun 342(4): 1027-1033.
- Senff-Ribeiro, A., P. Henrique da Silva, et al. (2008). "Biotechnological applications of brown spider (Loxosceles genus) venom toxins." Biotechnol Adv 26(3): 210-218.
- SESA/DEVA/DVVZI/SINAN (2011). " Dados Sobre os Acidentes com Animais Peçonhentos no Estado do Paraná. Curitiba: Centro de Saúde Ambiental / Div. Zoonoses e Animais Peçonhentos, SESA - PR. ." Boletim Epidemiológico da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná.
- Sezerino, U. M., M. Zannin, et al. (1998). "A clinical and epidemiological study of Loxosceles spider envenoming in Santa Catarina, Brazil." Trans R Soc Trop Med Hyg 92(5): 546-548.
- Shimabuku, P. S., C. A. Fernandes, et al. (2011). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a Lys49-phospholipase A2 complexed with caffeic acid, a molecule with inhibitory properties against snake venoms." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 67(Pt 2): 249-252.
- Shumilina, E., V. Kiedaisch, et al. (2006). "Stimulation of suicidal erythrocyte death by lipoxygenase inhibitor Bay-Y5884." Cell Physiol Biochem 18(4-5): 233-242.

- Sigal, Y. J., M. I. McDermott, et al. (2005). "Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions." Biochem J 387(Pt 2): 281-293.
- Silvestre, F. G., C. S. de Castro, et al. (2005). "Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae)." Toxicon 46(8): 927-936.
- Siow, D. L., C. D. Anderson, et al. (2011). "Sphingosine kinase localization in the control of sphingolipid metabolism." Adv Enzyme Regul 51(1): 229-244.
- Smith, P. J. S., R. H. Sanger, et al. (2007). "Principles, Development and Applications of Self-Referencing Electrochemical Microelectrodes to the Determination of Fluxes at Cell Membranes."
- SMS/CE/CVE (2011). "Dados Epidemiológicos dos acidentes com animais peçonhentos. Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretária Municipal de Saúde." Boletim Epidemiológico da Secretária Municipal de Saúde (Curitiba).
- Soldatova, L. N., R. Cramer, et al. (1998). "Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*." J Allergy Clin Immunol 101(5): 691-698.
- Sood, P., R. Tuli, et al. (2004). "Seasonal epidemic of ocular caterpillar hair injuries in the Kangra District of India." Ophthalmic Epidemiol 11(1): 3-8.
- Stocker, W. and W. Bode (1995). "Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins." Curr Opin Struct Biol 5(3): 383-390.
- Stocker, W., F. Grams, et al. (1995). "The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins

- (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases." Protein Sci 4(5): 823-840.
- Swanson, D. L. and R. S. Vetter (2006). "Loxoscelism." Clin Dermatol 24(3): 213-221.
- Tambourgi, D. V., M. De Sousa Da Silva, et al. (2002). "Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases." Immunology 107(1): 93-101.
- Tambourgi, D. V., R. M. Gonçalves-de-Andrade, et al. (2010). "Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies." Toxicon 56(7): 1113-1119.
- Tambourgi, D. V., B. P. Morgan, et al. (2000). "Loxosceles intermedia spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis." Blood 95(2): 683-691.
- Tambourgi, D. V., M. F. Pedrosa, et al. (2007). "Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis." Mol Immunol 44(4): 576-582.
- Tamiji, J. and D. A. Crawford (2010). "Prostaglandin E(2) and misoprostol induce neurite retraction in Neuro-2a cells." Biochem Biophys Res Commun 398(3): 450-456.
- Tani, M., M. Ito, et al. (2007). "Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space." Cell Signal 19(2): 229-237.
- Taskesen, M., S. Akdeniz, et al. (2011). "A rare cause of severe periorbital edema and dermonecrotic ulcer of the eyelid in a child: brown recluse spider bite." Turk J Pediatr 53(1): 87-90.

- Tavares, F. L., M. E. Peichoto, et al. (2011). "Loxosceles gaucho spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets." Hum Exp Toxicol.
- Teo, A. S., J. D. Ramos, et al. (2006). "Expression of the Blomia tropicalis paramyosin Blo t 11 and its immunodominant peptide in insect cells." Biotechnol Appl Biochem 45(Pt 1): 13-21.
- Thunnissen, M. M., E. Ab, et al. (1990). "X-ray structure of phospholipase A2 complexed with a substrate-derived inhibitor." Nature 347(6294): 689-691.
- Trevisan-Silva, D., L. H. Gremski, et al. (2010). "Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus Loxosceles)." Biochimie 92(1): 21-32.
- Ullah, A., P. O. de Giuseppe, et al. (2011). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from Loxosceles intermedia venom." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 67(Pt 2): 234-236.
- Unno, T., H. Okamoto, et al. (2003). "Possible Involvement of Phospholipase C in Activation of the Muscarinic Receptor-Mediated Cation Current in Intestinal Smooth Muscle." Neurophysiology 35(3): 348-348.
- Valdez-Cruz, N. A., S. Davila, et al. (2004). "Biochemical, genetic and physiological characterization of venom components from two species of scorpions: Centruroides exilicauda Wood and Centruroides sculpturatus Ewing." Biochimie 86(6): 387-396.
- van Meeteren, L. A., F. Frederiks, et al. (2004). "Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine." J Biol Chem 279(12): 10833-10836.

- Vega, J., J. M. Vega, et al. (2004). "Occupational immunologic contact urticaria from pine processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa*): experience in 30 cases." Contact Dermatitis 50(2): 60-64.
- Vega, J. M., I. Moneo, et al. (1999). "Allergy to the pine processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa*)." Clin Exp Allergy 29(10): 1418-1423.
- Vega, J. M., I. Moneo, et al. (1997). "Anaphylaxis to a pine caterpillar." Allergy 52(12): 1244-1245.
- Vega, J. M., I. Moneo, et al. (2000). "Pine processionary caterpillar as a new cause of immunologic contact urticaria." Contact Dermatitis 43(3): 129-132.
- Veiga, A. B., B. Blochtein, et al. (2001). "Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae)." Toxicon 39(9): 1343-1351.
- Veiga, A. B., A. F. Pinto, et al. (2003). "Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars." Thromb Res 111(1-2): 95-101.
- Veiga, A. B., J. M. Ribeiro, et al. (2005). "A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome." Gene 355: 11-27.
- Veiga, S. S., R. B. da Silveira, et al. (2000). "Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom." Toxicon 38(6): 825-839.
- Veiga, S. S., L. Feitosa, et al. (2000). "Effect of brown spider venom on basement membrane structures." Histochem J 32(7): 397-408.

- Veiga, S. S., W. Gremski, et al. (1999). "Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity." Toxicon 37(4): 587-607.
- Veiga, S. S., V. C. Zanetti, et al. (2001). "Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins." Braz J Med Biol Res 34(7): 843-850.
- Veiga, S. S., V. C. Zanetti, et al. (2001). "In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells." Thromb Res 102(3): 229-237.
- Vetter, R. S. and G. K. Isbister (2008). "Medical aspects of spider bites." Annu Rev Entomol 53: 409-429.
- Vojtova, J., O. Kofronova, et al. (2006). "Bordetella adenylate cyclase toxin induces a cascade of morphological changes of sheep erythrocytes and localizes into clusters in erythrocyte membranes." Microsc Res Tech 69(2): 119-129.
- Vuitika, L. (2011). Clonagem, expressão heteróloga e caracterização biológica de uma nova isoforma de fosfolipase-D do veneno de Aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*). Biologia Celular. Curitiba, Universidade Federal do Paraná. Master's: EM ANDAMENTO (NÃO PUBLICADO).
- Walker, E. M., J. R. Bispham, et al. (1998). "Nonselective effects of the putative phospholipase C inhibitor, U73122, on adenosine A1 receptor-mediated signal transduction events in Chinese hamster ovary cells." Biochem Pharmacol 56(11): 1455-1462.
- Werno, J., M. Lamy, et al. (1993). "Caterpillar hairs as allergens." Lancet 342(8876): 936-937.
- White, J. (2010). "Venomous animals: clinical toxinology." EXS 100: 233-291.
- White, J. (2011). "Clinical toxinology." Curr Infect Dis Rep 13(3): 236-242.

- White, J., D. Warrell, et al. (2003). "Clinical toxinology--where are we now?" J Toxicol Clin Toxicol 41(3): 263-276.
- White, S. P., D. L. Scott, et al. (1990). "Crystal structure of cobra-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue." Science 250(4987): 1560-1563.
- Williams, C. M., K. S. Bellucci, et al. (2006). "Erythematous papular rash on the upper back area. Caterpillar dermatitis, or erucism." Arch Dermatol 142(11): 1501-1506.
- Williams, S. T., V. K. Khare, et al. (1995). "Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. A report of two cases and review of the literature." Am J Clin Pathol 104(4): 463-467.
- Winnebeck, E. C., C. D. Millar, et al. (2010). "Why does insect RNA look degraded?" J Insect Sci 10: 159.
- Yancey, P. G., W. V. Rodriguez, et al. (1996). "Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux." J Biol Chem 271(27): 16026-16034.
- Yang, L., D. A. Andrews, et al. (2000). "Lysophosphatidic acid opens a Ca(++) channel in human erythrocytes." Blood 95(7): 2420-2425.
- Zanetti, V. C., R. B. da Silveira, et al. (2002). "Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom." Blood Coagul Fibrinolysis 13(2): 135-148.
- Zannin, M., D. M. Lourenco, et al. (2003). "Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, southern Brazil." Thromb Haemost 89(2): 355-364.

Ziereis, F. (2011). "Saturnidae World: Homepage für den Saturniidenfreund."

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1: Sequência nucleotídica do cDNA clonado da toxina dermonecrótica (LiRecDT1 selvagem) de *Loxosceles intermedia* e a dedução da sequência de aminoácidos (Chaim *et al.*, 2006). O círculo indica o local de substituição do aminoácido Histidina por Alanina. O que acarreta na redução drástica da atividade esfingomielinásica *in vitro*.

```

1      TCATGTTGCCGTACATTGTCTAGTATTGGGGTGTGGAGCGTCTTGTCCCAGGCTGCTCAAACAGATGATGAAGAACGC
   I      M L P Y I V L V L G C W S V L S Q A A Q T D D E E R

      30Rec sense
      CTCGAGGCAGGTAATCGTCGGCCATATA
81      GCAGGTAATCGTCGGCCATATATGGATCATGGGGCATGGTAAATGCCATCGGTGAGATAGACGAGTTCGTGAACCTT
   27      A G N R R P I W I M G H M V N A I G Q I D E F V N L
159      GGAGCAAACCTCCATCGAAACAGACGTGTCTTTCGATGACAATGCCAATCCTGAGTATACTTATCAGGCATTCCATGT
   53      G A N S I E T D V S F D D N A N P E Y T Y H G I P C
237      GATTGTGGAAGGAATTGCAAGAAATATGAGAATTTTAACGATTTTCTGAAAGGTCTCCGAAGCGCCACAAACACCTGGT
   79      D C G R N C K K Y E N F N D F L K G L R S A T T P G
315      AATTCAAAGTATCAGGAAAACTGGTCTTAGTCGTGTTCGACTTAAAGACAGGTAGCCTCTACGATAATCAAGCCAAC
   105      N S K Y Q E K L V L V V F D L K T G S L Y D N Q A N
393      GACGCCGGAAGAAATTGGCGAAGAATCTCTTACAACATTACTGGAACAATGGCAATAATGGTGAAGAGCATAcata
   131      D A G K K L A K N L L Q H Y W N N G N N G G R A Y I
471      GTGTTATCGATCCAGACCTTAATCATTATCCACTGATTAAAGGATTCAAAGACAGCTTACAAAGGACGACACCCA
   157      V L S I P D L N H Y P L I K G F K D Q L T K D G H P
549      GAGTTGATGGACAAAGTTGGACACGACTTCTCCGAAAACGACGACATCGGCGACGTTGGAAAAGCTTACAAGAAAGCA
   183      E L M D K V G H D F S G N D D I G D V G K A Y K K A
627      GGAATAACTGGCCATATTTGGCAGAGCGATGGTATCACCAACTGTTTACCACGTGGCCTTAGTCGTGTGAACGACGCT
   209      G I T G H I W Q S D G I T N C L P R G L S R V N A A
705      GTGGCAAACAGAGATTCCGCAAACGGATTCTTAACAAAGTGTACTACTGGACAGTGGACAAGCGCTCAACGACCAGA
   235      V A N R D S A N G F I N K V Y Y W T V D K R S T T R
783      GATGCACTTGATGCTGGAGTTGACGGCATAATGACCAACTACCCGGATGTTATCACTGATGTTCTCAACGAAGCCGCA
   261      D A L D A G V D G I M T N Y P D V I T D V L N E A A

      30Rec antisense
      ACCCACTGTAAGTCTTTTATTCCTAGGGC
861      TACAAGAAGAAATTCGAGTTGCCACATACGACGAAAAATCCATGGGTGACATTCAAGAAATAAATCTGCAGGTTGAT
   287      Y K K K F R V A T Y D E N P W V T F K K *
939      TGTGGAAAAACACATGGCAATCTGGATTTACGATTTTCATTGAACTTTGTTGAAAAACCAATTTGATGCGAAAAACT
1017      AAAAATATGCACTATGGAAGCTTTGTTCAAAATATGTTTGTATTATTGTAACATGTTTGAAAAAGTATTTTCA
1095      GAAATAAATTTTGATCCATGTAAAAA

```

ANEXO 2: DEMAIS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

ANEXO 2.1 Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge.

Biochem Biophys Res Commun. 2011 Jun 17;409(4):622-7. Epub 2011 May 17.

de Giuseppe PO, Ullah A, Silva DT, Gremski LH, Wille AC, Chaves Moreira D, Ribeiro AS, Chaim OM, Murakami MT, Veiga SS, Arni RK.

Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, 13083-970 SP, Brazil.

Phospholipases D (PLDs) are principally responsible for the local and systemic effects of *Loxosceles* envenomation including dermonecrosis and hemolysis. Despite their clinical relevance in loxoscelism, to date, only the SMase I from *Loxosceles laeta*, a class I member, has been structurally characterized. The crystal structure of a class II member from *Loxosceles intermedia* venom has been determined at 1.7Å resolution. Structural comparison to the class I member showed that the presence of an additional disulphide bridge which links the catalytic loop to the flexible loop significantly changes the volume and shape of the catalytic cleft. An examination of the crystal structures of PLD homologues in the presence of low molecular weight compounds at their active sites suggests the existence of a ligand-dependent rotamer conformation of the highly conserved residue Trp230 (equivalent to Trp192 in the glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Thermus thermophilus*, PDB code: 1VD6) indicating its role in substrate binding in both enzymes. Sequence and structural analyses suggest that the reduced sphingomyelinase activity observed in some class IIb PLDs is probably due to point mutations which lead to a different substrate preference.

ANEXO 2.2 Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom.

Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2011 Feb 1;67(Pt 2):234-6 Epub 2011 Jan 22.

Ullah A, de Giuseppe PO, Murakami MT, Trevisan-Silva D, Wille AC, Chaves Moreira D, Gremski LH, da Silveira RB, Sennf-Ribeiro A, Chaim OM, Veiga SS, Arni RK.

Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto-SP, Brazil.

Phospholipases D are the major dermonecrotic component of *Loxosceles* venom and catalyze the hydrolysis of phospholipids, resulting in the formation of lipid mediators such as ceramide-1-phosphate and lysophosphatidic acid which can induce pathological and biological responses. Phospholipases D can be classified into two classes depending on their catalytic efficiency and the presence of an additional disulfide bridge. In this work, both wild-type and H12A-mutant forms of the class II phospholipase D from *L. intermedia* venom were crystallized. Wild-type and H12A-mutant crystals were grown under very similar conditions using PEG 200 as a precipitant and belonged to space group P12(1)1, with unit-cell parameters $a = 50.1$, $b = 49.5$, $c = 56.5$ Å, $\beta = 105.9^\circ$. Wild-type and H12A-mutant crystals diffracted to maximum resolutions of 1.95 and 1.60 Å, respectively.

ANEXO 2.3 Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes

Toxins 2011, 3, 309-344; doi:10.3390/toxins3030309 (Published: 22 March 2011)

Olga Meiri Chaim, Dilza Trevisan-Silva, Daniele Chaves-Moreira, Ana Carolina M. Wille, Valéria Pereira Ferrer, Fernando Hitomi Matsubara, Oldemir Carlos Mangili, Rafael Bertoni da Silveira, Luiza Helena Gremski, Waldemiro Gremski, Andrea Senff-Ribeiro and Silvio Sanches Veiga.

Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, CEP 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil.

Venomous animals use their venoms as tools for defense or predation. These venoms are complex mixtures, mainly enriched of proteic toxins or peptides with several, and different, biological activities. In general, spider venom is rich in biologically active molecules that are useful in experimental protocols for pharmacology, biochemistry, cell biology and immunology, as well as putative tools for biotechnology and industries. Spider venoms have recently garnered much attention from several research groups worldwide. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom is enriched in low molecular mass proteins (5–40 kDa). Although their venom is produced in minute volumes (a few microliters), and contain only tens of micrograms of protein, the use of techniques based on molecular biology and proteomic analysis has afforded rational projects in the area and permitted the discovery and identification of a great number of novel toxins. The brown spider phospholipase-D family is undoubtedly the most investigated and characterized, although other important toxins, such as low molecular mass insecticidal peptides, metalloproteases and hyaluronidases have also been identified and featured in literature. The molecular pathways of the action of these toxins have been reported and brought new insights in the field of biotechnology. Herein, we shall see how recent reports describing discoveries in the area of brown spider venom have expanded biotechnological uses of molecules identified in these venoms, with special emphasis on the construction of a cDNA library for venom glands, transcriptome

analysis, proteomic projects, recombinant expression of different proteic toxins, and finally structural descriptions based on crystallography of toxins.

ANEXO 3: Certificados



Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge

Priscila Oliveira de Giuseppe^{a,1}, Anwar Ullah^{b,1}, Dilza Trevisan Silva^c, Luiza Helena Gremski^c, Ana Carolina Martins Wille^{c,d}, Daniele Chaves Moreira^c, Andrea Senff Ribeiro^c, Olga Meiri Chaim^c, Mario Tyago Murakami^a, Silvio Sanches Veiga^c, Raghuvir Krishnaswamy Arni^{b,*}

^a Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, 13083-970 SP, Brazil

^b Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, 15054-000 SP, Brazil

^c Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 80060-000 PR, Brazil

^d Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2011

Available online 17 May 2011

Keywords:

Loxosceles spider venom

Phospholipase D

Crystal structure

ABSTRACT

Phospholipases D (PLDs) are principally responsible for the local and systemic effects of *Loxosceles* envenomation including dermonecrosis and hemolysis. Despite their clinical relevance in loxoscelism, to date, only the SMase I from *Loxosceles laeta*, a class I member, has been structurally characterized. The crystal structure of a class II member from *Loxosceles intermedia* venom has been determined at 1.7 Å resolution. Structural comparison to the class I member showed that the presence of an additional disulphide bridge which links the catalytic loop to the flexible loop significantly changes the volume and shape of the catalytic cleft. An examination of the crystal structures of PLD homologues in the presence of low molecular weight compounds at their active sites suggests the existence of a ligand-dependent rotamer conformation of the highly conserved residue Trp230 (equivalent to Trp192 in the glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Thermus thermophilus*, PDB code: 1VD6) indicating its role in substrate binding in both enzymes. Sequence and structural analyses suggest that the reduced sphingomyelinase activity observed in some class IIb PLDs is probably due to point mutations which lead to a different substrate preference.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Envenomation by brown spiders (*Loxosceles* spp.) leads to a strong local dermonecrotic effect (cutaneous loxoscelism) and systemic manifestations, whose symptoms include hematuria, hemoglobinuria, jaundice and fever [1–3]. Although, the systemic loxoscelism occurs in a minority of cases, it can be fatal, especially in children [1–3].

Phospholipases D (PLD) are considered the main components responsible for the local and systemic effects of *Loxosceles* venom including dermonecrosis, renal toxicity and hemolysis [4–9]. *Loxosceles* PLDs (30–35 kDa), also referred to as dermonecrotic toxins, were primarily designated as sphingomyelinases D (SMases D) due to their ability to convert sphingomyelin to choline and ceramide 1-phosphate (*N*-acylsphingosine 1-phosphate) [4]. As some *Loxosceles* PLDs have broad substrate specificity, being able

to hydrolyze not only sphingophospholipids but also lysoglycerophospholipids, they are now classified as phospholipases D [10–12].

PLDs can be grouped into two classes based on sequence, structural and biochemical data [13]. The class I, represented by PLD I from *Loxosceles laeta*, is characterized by the presence of a single disulphide bridge (Cys51–Cys57) and an extended hydrophobic loop (variable loop). Class II comprises PLDs that contain an additional intra-chain disulphide bridge linking the flexible loop and the catalytic loop. Depending on their ability to hydrolyze sphingomyelin, they are further subdivided into classes IIa (more active) and IIb (less active or inactive), respectively [13].

Despite the clinical importance of these enzymes in loxoscelism, to date, only the PLD I from *L. laeta*, a class I member, had been structurally characterized [14]. Based on its crystal structure, an acid-base catalytic mechanism was proposed, where His12 and His47 play key roles and are supported by a network of hydrogen bonds between Asp34, Asp52, Trp230, Asp233, and Asn252 [14]. However, the vast majority of *Loxosceles* PLDs belongs to the class II, and none of their three-dimensional structures have been determined. A representative member of class II PLD is the dermonecrotic toxin isoform 1 from *Loxosceles intermedia* [11]. The recombinant protein

* Corresponding author.

E-mail address: arni@ibilce.unesp.br (R.K. Arni).

¹ Both authors have contributed equally to this work.

(LiRecDT1) is able to hydrolyze sphingomyelin and presents dermonecrotic and hemolytic activities, characteristics of the whole venom [10,11,15,16]. Moreover, LiRecDT1 is able to directly induce renal injuries in mice and its nephrotoxic effects are dependent on its catalytic activity [11]. It has also been demonstrated that LiRecDT1 released choline from endothelial and kidney cell membrane extracts and bound to various lipids, such as sphingomyelin, lyso-phosphatidylcholine and cholesterol [12].

This work presents the first crystal structure of a *Loxosceles* venom class II PLD, the dermonecrotic toxin isoform 1 from *L. intermedia*. A comparison of the three-dimensional structures of class I and II PLDs, indicates the effect of an additional disulfide bridge which links the surface loops on the volume and shape of the catalytic cleft. Sequence and structural analyses suggest that the reduced or absent sphingomyelinase activity of some class IIb PLDs [15,17,18] is probably due to mutations of amino acid residues affecting substrate affinity or protein stability, since all catalytically-relevant residues are fully conserved. Moreover, the mutations observed at the catalytic pocket of these proteins are the same encountered in the active PLD 2 from *L. laeta* [19].

2. Materials and methods

2.1. Expression and purification

Mature dermonecrotic toxin isoform 1 from *L. intermedia* (LiRecDT1) was cloned into a pET-14b vector (Novagen, Madison, USA) and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS cells (Invitrogen) as described previously [20]. Expression was induced by the addition of 0.05 mM IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) during 3.5 h at 303 K after the cell culture had reached an OD₅₅₀ of 0.5.

Cell suspension was disrupted by six 10 s-cycles of sonication. Lysed material was centrifuged (20,000g, 20 min) and the supernatant was incubated with 1 ml Ni²⁺-NTA agarose beads for 1 h at 277 K. The suspensions were loaded onto a column and the packed gel was washed with 50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole. The recombinant protein was eluted with 10 ml of the above buffer which additionally contained 250 mM imidazole and 1 ml fractions were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Fractions were pooled and dialyzed against phosphate buffer saline (PBS).

2.2. Crystallization

The LiRecDT1 protein was crystallized by vapor diffusion in sitting drops using a Cartesian HoneyBee 963 system (Genomic Solutions) at 291 K as described in [20]. Optimal crystals were observed in drops containing 2 μ l of the protein solution (17 mg ml⁻¹) and 2 μ l of the reservoir solution equilibrated over 1 ml of reservoir solution (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 40% (v/v) PEG200).

2.3. Data collection and processing

LiRecDT1 crystals were directly flash-cooled in a 100 K nitrogen-gas stream. X-ray diffraction data were collected on the W01B-MX2 beamline at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (Campinas, Brazil) as described in earlier [20]. The data were indexed, integrated and scaled using the DENZO and SCALEPACK programs from the HKL-2000 package [21]. Data collection and refinement statistics are summarized in Table 1.

2.4. Structure solution and refinement

The initial structural model of LiRecDT1 was determined by molecular-replacement using the program MOLREP [22] and the

Table 1

Data collection and refinement statistics.

Data collection ^a	
Temperature (K)	100
Radiation source	W01B-MX2 (LNLS, Brazil)
Wavelength (Å)	1.458
Detector	MarMosaic 225
Space group	P12 ₁ 1
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 49.81$, $b = 49.30$ and $c = 56.30$; $\beta = 105.83$
Resolution range (Å)	24.65–1.72 (1.81–1.72)
R_{merge} ^b (%)	9.7 (46.8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	8.1 (2.0)
Data completeness (%)	99.9 (99.9)
No. of measured reflections	102,021 (14,085)
No. of unique reflections	28,041 (4040)
Multiplicity	3.6 (3.5)
Structure refinement statistics	
R_{factor}	17.2
R_{free}	21.4
r.m.s.d. Bond distances (Å)	0.023
r.m.s.d. Bond angles (°)	1.930
Ramachandran outliers (%)	0
Ramachandran favored (%)	99.3
Average B-factors (Å ²)	17.74

^a Values in parentheses are for the last resolution shell.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the i th observation of reflection hkl and $\langle I(hkl) \rangle$ is the weighted average intensity for all observations I of reflection hkl .

atomic coordinates of PLD 1 from *L. laeta* as the template (PDB code 1XX1; [14]). Model refinement was carried out alternating cycles of REFMAC5 [23] with visual inspection of the electron density maps and manual rebuilding with COOT [24]. A total of 278 residues were modeled, comprising LiRecDT1 residues from Gly2 to Lys284, numbered according to the class I phospholipase D structure (PDB code 1XX1; [14]). Water molecules were added using COOT [24] during the last refinement cycles. One magnesium ion (Mg²⁺), two ethylene glycol (EDO), four diethylene glycol (PEG) and one triethylene glycol (PGE) were modeled based on the difference Fourier map of LiRecDT1. The final model consists of one monomer and was established after the convergence of R_{factor} and R_{free} values to 17.2% and 21.4%, respectively. Analyses of monomer–monomer interfaces using the PISA web server [25] did not indicate any biologically relevant quaternary structure in the crystal. Stereochemistry of the model was analyzed with Molprobit [26]. No outlier was observed in the Molprobit Ramachandran plot and more than 99% of the residues are in its favored region. Data collection and structure refinement statistics are summarized in Table 1. Figures were produced using the program Py-mol [27].

2.5. Molecular modeling and quality analysis

The atomic coordinates of LiRecDT1 (PDB code: 3RLH) was used as the initial model to obtain three-dimensional models of LiRecDT3 from *L. intermedia* (ABB71184.1) and Lb3 from *L. boneti* (AAT66074.1), using the modeling option of the Swiss-Model server [28]. For energy minimization, the final models were submitted under explicit solvent molecular dynamics (MD) simulations using YASARA until the convergence of root mean square deviation (r.m.s.d.) (Fig. S1). The overall and local quality analysis of the final model was assessed by ProSA-web [29] and Molprobit [26]. More than 99% of the residues of both models are in the favored region of the Ramachandran plot. ProSA-web analyses indicated that the referred models present Z-scores within the range typically observed for native proteins of similar size.

3. Results and discussion

3.1. Overall structure

LiRecDT1 is a single domain protein which folds into a TIM (α/β)₈-barrel with the insertion of additional β -strands and α -helices (Fig. 1). FastSCOP [30] analysis indicates that this class II PLD belongs to the phospholipase C (PLC) like phosphodiesterases superfamily, suggesting that PLDs share a common ancestor with PLC like domains encountered in mammalian phospholipase C isozyme D1 [30], bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C [31] and glycerophosphodiester phosphodiesterases [32].

The catalytic (blue), variable (green), flexible (red) and other short loops surround the active site cleft (Fig. 1). The catalytic loop, which contains the catalytically important residue, His47, forms a hairpin due to the presence of a disulphide bridge (Cys51–Cys57). A network of hydrogen bonds ensures the correct relative orientation of the hairpin in relation to the core of the protein.

3.2. Structural comparison between class I and II phospholipases D

LiRecDT1 superimposes on the class I PLD from *L. laeta* (SMase I) (PDB code: 1XX1; [19]) with a r.m.s. deviation of 0.938 Å for 268 C α atoms and a sequence identity of 61.6 %. The main conformational changes are observed at the flexible and variable loops (Fig. 1). LiRecDT1 possesses a disulfide bridge between Cys53 and Cys201, which causes a large displacement of the flexible loop towards the catalytic loop (Fig. 1). This disulfide bridge is well conserved in class II PLDs, but absent in class I PLD due to the mutation C201F (Fig. 2).

Regarding the variable loop, a five-residue insertion (YLPSL), which protrudes from the core structure of class I PLD, is absent in the class II PLD (Figs. 1 and 2). Moreover, the three last residues that compose the variable loop are not conserved between class I and class II PLDs (Fig. 2). The mean *B*-factors for the main-chain atoms of the variable loops are 26.39 Å² and 15.86 Å² for class I (PDB code: 1XX1, chain A) and class II respectively, indicating that the class I variable loop is significantly more flexible than that of class II.

In the class II PLD, the flexible loop is displaced towards the catalytic loop and partially occludes an electronegative cleft that leads to the active site in the class I PLD (Fig. 3). This results in a volumetric reduction of the cavity that forms the catalytic site of the class II PLD. Based on SURFNET analysis [33], the volume and average depth of the cleft observed at the class I PLD catalytic face are 4339.4 Å³ and 15.2 Å, respectively. These values are considerably larger than those estimated for the corresponding cavity at the class II PLD (volume 1468.1 Å³, average depth 10.1 Å). Besides the lack of the disulfide bridge connecting the catalytic and flexible loops, the protrusion of variable loop and the substitution N137G also account for the enlargement of the cleft surrounding the catalytic site of the class I PLD (Fig. 3).

A large electronegative patch, which includes the variable loop, is observed surrounding the right side of the class II PLD catalytic pocket. However, in the class I PLD, this patch is interrupted by the longer variable loop that forms a protrusion with neutral potential (Fig. 3). Interestingly, an electronegative cleft, hidden by the neutral catalytic and flexible loops in the class II PLD, is exposed in the class I PLD, due to the absence of a disulfide bridge connecting these loops. Thus, in the class I PLD the impairment in the electronegative potential of a patch at the right side of the catalytic pocket seems to be compensated by the exposure of another electronegative patch on the left side.

Together, these differences observed in the topography and electrostatic potential distribution of class I and II PLDs catalytic faces suggest that these enzymes might have different ways to guide the substrate into the catalytic pocket.

3.3. Active site

The Mg²⁺ binding site and the two catalytic histidine residues (His12 and His47), which compose the active-site pocket are strictly conserved in both classes of spider venom PLDs (Fig. 2). Interestingly, at the active site of LiRecDT1, the difference Fourier map contained residual density. However, neither substrates nor products could account for this density. This residual density was modeled as two PEG molecules with partial occupancy.

In the LiRecDT1 structure, the Mg²⁺ ion (*B* factor of 14.26 Å² and a mean Mg–O bond distance of 2.1 Å) is hexacoordinated by the carboxyl oxygens of Glu32, Asp34, Asp91, one water molecule and two PEG4 oxygens. The same geometric coordination is observed for the Mg²⁺ ion in class I PLD structure bound to a sulfate ion [13]. As pointed out earlier, *Loxosceles* PLDs and glycerophosphodiester phosphodiesterases (GDPDs) share a similar divalent metal dependent catalytic mechanism and probably evolved from a common ancestor [14]. In spite of their different specificities, structural comparisons of the PLD and GDPD active sites suggest that they share not only residues involved in metal binding and catalysis but also in substrate binding such as Lys93 and Trp230 (Fig. 4A). Murakami et al. have suggested a role for Lys93 and Trp230 in the orientation of the substrate in both spider and bacterial PLDs [14]. Structural analysis indicates that the Lys residue might interact with the phosphate moiety of GDPDs substrates. Moreover, since the mutation K121A greatly reduces the enzymatic activity of the *Thermoanaerobacter tengcongensis* GDPD, suggesting that this Lys residue affects catalysis via electronic

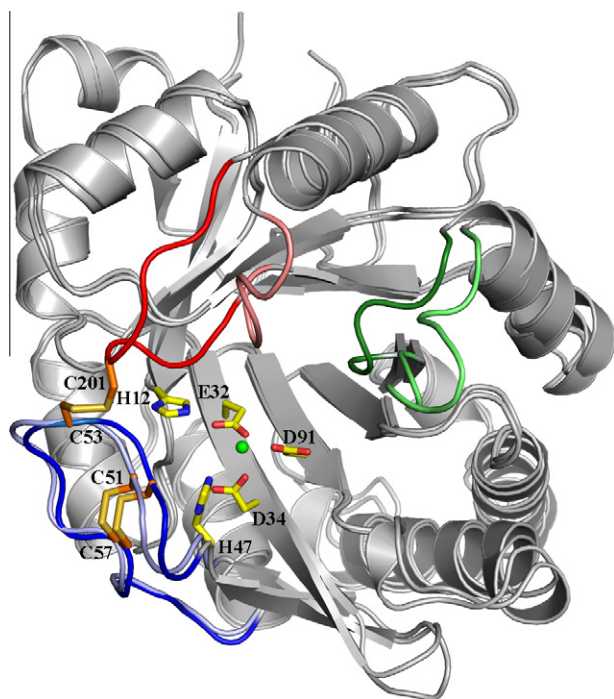


Fig. 1. Structural alignment between LiRecDT1 (class II) and PLD I from *L. laeta* (class I). The LiRecDT1 residues involved in metal-ion binding and catalysis are presented in atom colors (PDB code: 3RLH). The Mg²⁺ ion is shown as a green sphere. The catalytic, flexible, and variable loops are colored in blue, red, and green, respectively. Dark and light colors refer to LiRecDT1 and *L. laeta* PLD, respectively. The disulfide bridges are presented by orange sticks. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

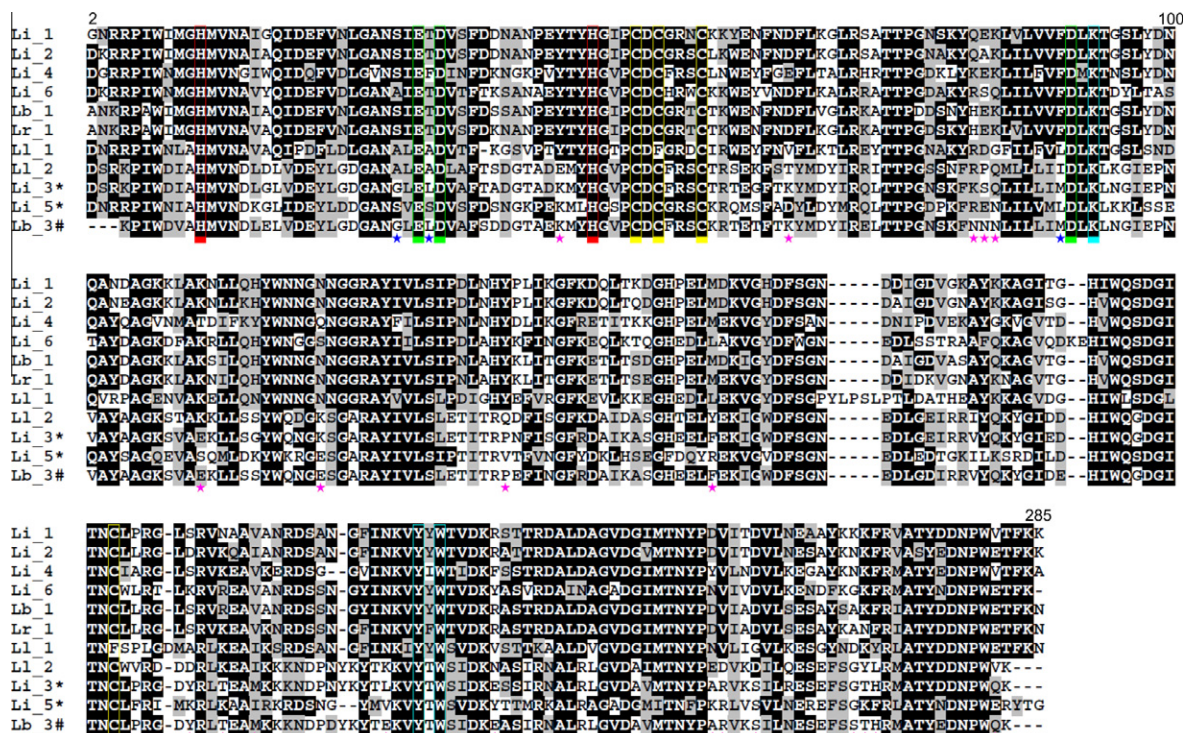


Fig. 2. Multiple sequence alignment of class I and II PLDs. Li_1 (LiRecDT1, PDB code: 3RLH), Li_2 (LiRecDT2, ABB69098.1), Li_3 (LiRecDT3, ABB71184.1), Li_4 (LiRecDT4, ABD91846.1), Li_5 (LiRecDT5, ABD91847.1) and Li_6 (LiRecDT6, ABO87656.1) are PLDs paralogs from *L. intermedia*. Li_1 (AAM21154.1, PDB code: 1XX1) and Li_2 (AAM21156.1) are isoforms from *L. laeta*, Lb_1 (AAT66073.1) and Lb_3 (AAT66074.1) are PLDs from *L. boneti* and Lr_1 (AAT66075.1) is a PLD from *L. reclusa*. The symbols * and # indicate PLDs with reduced or abolished sphingomyelinase activity, respectively. Residues involved in metal-ion binding and catalysis are boxed in green and red, while cysteines are boxed in yellow. Residues possibly involved in substrate binding and orientation are boxed in cyan. The numbers represent the class I PLD sequence. Stars indicate amino acid substitutions occurred specifically in PLDs with reduced or abolished sphingomyelinase activity. Blue stars refer to buried residues near the metal-binding site and pink stars refer to surface-exposed residues. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

interaction with the phosphate moiety of the substrate [34]. A similar role might be attributed to the corresponding Lys residue in spider PLDs.

Trp230, strategically located at the bottom of the active site, adopts different rotamer conformations depending on the presence of ligands (Fig. 4B and C). The equivalent in the GDPD from *Thermus thermophilus* is Trp192 (PDB code: 1VD6). In the presence of PEG (PDB code: 3RLH) or glycerol (PDB code: 1VD6) molecules, Trp230(192) forms one of the walls of the active site pocket, freeing space for ligand binding. The presence of a sulfate ion in the active site of class I PLD (PDB code: 1XX1) induces another conformation of Trp230 by the formation of a hydrogen bond between the NE1 nitrogen of Trp230 and the sulfate O1 atom. Contrastingly, in the ligand free form of class I PLD (PDB code: 2F9R), the Trp230 ring adopts a third conformation in which the torsion angle χ_2 changes by -90° in relation to the Trp230 conformation in presence of PEG or glycerol. These findings suggest that Trp230 motions might play a pivotal role in substrate binding in both *Loxosceles* venom PLDs and bacterial GDPDs.

3.4. Functional diversification in spider venom PLDs

The spider venom PLDs encompass a gene family with multiple orthologs and paralogs, which differ in catalytic efficiency, substrate specificity or intensity of biological effects [7,10,11,15–19,35,36]. A structure-based classification segregates these enzymes into two major groups as mentioned in the introduction. This classification is in agreement with recent phylogenetic analysis of a large set of Sicariid spider venom PLDs, which grouped members of different classes into distinct branches belonging to

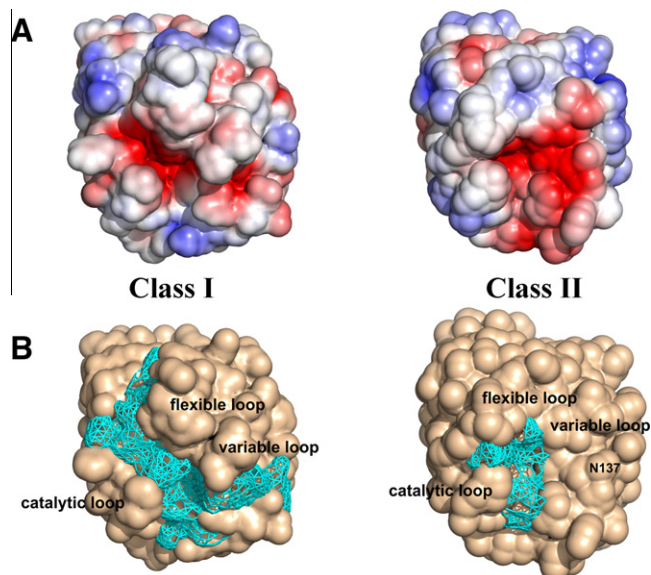


Fig. 3. Solvent accessible surface analyses of class I and II PLDs. (A) Electrostatic surface of class I (left) and II (right) PLDs are colored by charge, from red (-2 kV) to blue ($+2$ kV). Electrostatic potential was calculated using PBEQ solver [38]. (B) Representation of the largest cavities (cyan) in the respective class I and II PLD structures. Models are oriented according to Fig. 1. Class I PLD = PDB code: 1XX1, chain A. Class II PLD = PDB code: 3RLH. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

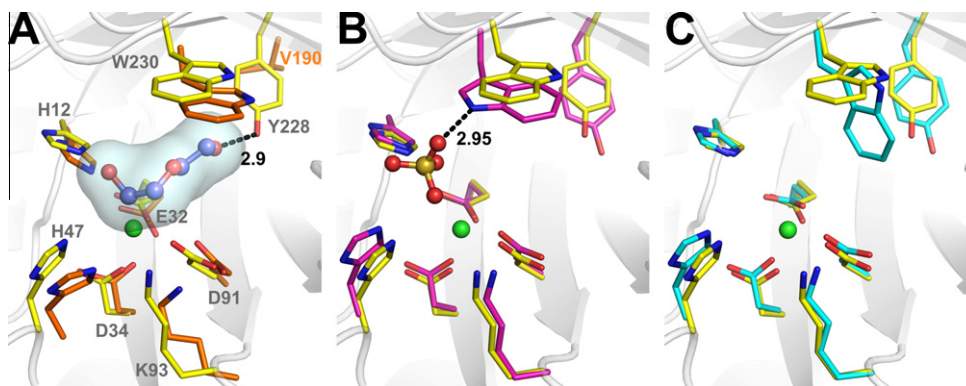


Fig. 4. The active site. Structural alignment among class I and II PLDs and a glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDPD) from *Thermus thermophilus*. (A) Representation of class II PLD (carbon atoms in yellow) and GDPD (carbon atoms in orange) superposed structures highlighting the PEG molecule (carbon atoms in violet) from the class II PLD structure. (B) Representation of class II PLD and class I PLD (carbon atoms in magenta) superposed structures showing the sulfate ion from the class I structure. (C) Representation of class II PLD and the sulfate-free class I (cyan C atoms) superposed structures. Nitrogen, oxygen, sulfur and magnesium atoms are colored blue, red, wheat and green, respectively. PDB codes: GDPD (1VD6:A), class I PLD (1XX1:D), sulfate free class I PLD (2F9R:B), class II PLD (3RLH). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

two major clades (α and β). Clade α includes class I and IIa PLDs whereas clade β includes class IIb PLDs [36].

In an attempt to understand the structural determinants for the functional divergence of β clade members with reduced sphingomyelinase activity [15], we analyzed mutations exclusively observed in these enzymes (Fig. 2). Three of these mutations (S30G, T33L, F90M), are observed at the protein hydrophobic core and prediction of protein stability by the PoPMuSiC program [37] suggests that the substitutions S30G and F90M may have a destabilizing effect. The other substitutions are sparsely distributed on the LiRecDT1 surface relatively far from the catalytic pocket. Considering the long aliphatic tail of sphingomyelin, changes in the charge distribution and surface shape of the catalytic face induced by some of these mutations may affect the protein–lipid interaction and, consequently, their substrate affinity.

This analysis of the active site pockets in the structures of the class I, the class II and the modeled structure of Lb3 did not provide a clear explanation for the reduced or absent sphingomyelinase activity of LiRecDT3 and Lb3. These proteins conserve the Mg^{2+} binding site residues along with Lys93, Tyr228, Trp230 and the two catalytic histidine residues (His12 and His47) (Fig. 2 and Fig. S2). Moreover, the substitutions observed at their catalytic site are the same encountered in the active LI2 enzyme. This suggests that LiRecDT3, LiRecDT5 and Lb3 may not be devoid of catalytic activity but might possess affinity to other substrates. This hypothesis is supported by the fact that some spider venom PLDs demonstrates broad substrate selectivity [13–15].

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, CNPq and CAPES, Brazil.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.053.

References

- [1] J.M. Futrell, *Loxoscelism*, Am. J. Med. Sci. 304 (1992) 261–267.
- [2] H.H. Sams, C.A. Dunnick, M.L. Smith, L.E. King, Necrotic arachnidism, J. Am. Acad. Dermatol. 44 (2001) 561–573.

- [3] P.H. da Silva, R.B. da Silveira, M.H. Appel, O.C. Mangili, W. Gremski, S.S. Veiga, Brown spiders and loxoscelism, *Toxicon* 44 (2004) 693–709.
- [4] L.J. Forrester, J.T. Barrett, B.J. Campbell, Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: the role of sphingomyelinase D, *Arch. Biochem. Biophys.* 187 (1978) 355–365.
- [5] G. Kurpiewski, L.J. Forrester, J.T. Barrett, B.J. Campbell, Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*, *Biochim. Biophys. Acta* 678 (1981) 467–476.
- [6] M.de F. Fernandes Pedrosa, I. de L.M. Junqueira de Azevedo, R.M. Gonçalves-de-Andrade, C.W. van den Berg, C.R.R. Ramos, P.L. Ho, et al., Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298 (2002) 638–645.
- [7] E. Kalapothakis, M. Chatzaki, H. Gonçalves-Dornelas, C.S. de Castro, F.G. Silvestre, F.V. Laborne, et al., The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom, *Toxicon* 50 (2007) 938–946.
- [8] D. Chaves-Moreira, O.M. Chaim, Y.B. Sade, K.S. Paludo, L.H. Gremski, L. Donatti, et al., Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom, *J. Cell. Biochem.* 107 (2009) 655–666.
- [9] O.M. Chaim, Y.B. Sade, R.B. da Silveira, L. Toma, E. Kalapothakis, C. Chávez-Olortegui, et al., Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211 (2006) 64–77.
- [10] L.A. van Meeteren, F. Frederiks, B.N.G. Giepmans, M.F.F. Pedrosa, S.J. Billington, B.H. Jost, et al., Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 10833–10836.
- [11] S. Lee, K.R. Lynch, Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA), *Biochem. J.* 391 (2005) 317–323.
- [12] O.M. Chaim, R.B. da Silveira, D. Trevisan-Silva, V.P. Ferrer, Y.B. Sade, M. Bóia-Ferreira, et al., Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity, *Biochim. Biophys. Acta* 1811 (2011) 84–96.
- [13] M.T. Murakami, M.F. Fernandes-Pedrosa, S.A. de Andrade, A. Gabdoulkhakov, C. Betzel, D.V. Tambourgi, et al., Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342 (2006) 323–329.
- [14] M.T. Murakami, M.F. Fernandes-Pedrosa, D.V. Tambourgi, R.K. Arni, Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 13658–13664.
- [15] R.B. de Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, J.L. Dreyfuss, L. Toma, et al., Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland, *Biochimie* 88 (2006) 1241–1253.
- [16] R.O.S. Ribeiro, O.M. Chaim, R.B. da Silveira, L.H. Gremski, Y.B. Sade, K.S. Paludo, et al., Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom, *Toxicon* 50 (2007) 1162–1174.
- [17] R.B. da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, J.L. Dreyfuss, et al., Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization, *Biochimie* 89 (2007) 289–300.
- [18] M.H. Appel, R.B. da Silveira, O.M. Chaim, K.S. Paludo, D.T. Silva, D.M. Chaves, et al., Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 167–178.

- [19] G.I. de Santi Ferrara, M.deF. Fernandes-Pedrosa, I. de L.M. Junqueira-de-Azevedo, R.M. Gonçalves-de-Andrade, F.C.V. Portaro, D. Manzoni-de-Almeida, et al., SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis, *Toxicon* 53 (2009) 743–753.
- [20] A. Ullah, P.O. de Giuseppe, M.T. Murakami, D. Trevisan-Silva, A.C.M. Wille, D. Chaves-Moreira, et al., Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom, *Acta Crystallogr. F67* (2011) 234–236.
- [21] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, in: *Macromolecular Crystallography Part A*, Academic Press, 1997, pp. 307–326.
- [22] A. Vagin, A. Teplyakov, MOLREP: an automated program for molecular replacement, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 1022–1025.
- [23] G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr. D53* (1997) 240–255.
- [24] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D60* (2004) 2126–2132.
- [25] E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 774–797.
- [26] V.B. Chen, W.B. Arendall, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, et al., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr. D66* (2010) 12–21.
- [27] W.L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA, (2002).
- [28] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3381–3385.
- [29] M. Wiederstein, M.J. Sippl, ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W407–W410.
- [30] J.A. Grobler, L.-O. Essen, R.L. Williams, J.H. Hurley, C2 domain conformational changes in phospholipase C- δ 1, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3 (1996) 788–795.
- [31] C.S. Güssler, M. Ryan, T. Liu, O.H. Griffith, D.W. Heinz, Probing the roles of active site residues in phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 36 (1997) 12802–12813.
- [32] K.N. Rao, J.B. Bonanno, S.K. Burley, S. Swaminathan, Crystal structure of glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Agrobacterium tumefaciens* by SAD with a large asymmetric unit, *Proteins* 65 (2006) 514–518.
- [33] R.A. Laskowski, SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions, *J. Mol. Graph.* 13 (1995) 323–330.
- [34] L. Shi, J.F. Liu, X.-M. An, D.C. Liang, Crystal structure of glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDPD) from *Thermoanaerobacter tengcongensis*, a metal ion-dependent enzyme: insight into the catalytic mechanism, *Proteins* 72 (2008) 280–288.
- [35] S.A. de Andrade, M.T. Murakami, D.P. Cavalcante, R.K. Arni, D.V. Tambourgi, Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom, *Toxicon* 47 (2006) 380–386.
- [36] G.J. Binford, M.R. Bodner, M.H.J. Cordes, K.L. Baldwin, M.R. Rynerson, S.N. Burns, et al., Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms, *Mol. Biol. Evol.* 26 (2009) 547–566.
- [37] Y. Dehouck, A. Grosfils, B. Folch, D. Gilis, P. Bogaerts, M. Rooman, Fast and accurate predictions of protein stability changes upon mutations using statistical potentials and neural networks: PoPMuSiC-2.0, *Bioinformatics* 25 (2009) 2537–2543.
- [38] S. Jo, M. Vargyas, J. Vasko-Szedlar, B. Roux, W. Im, PBEQ-solver for online visualization of electrostatic potential of biomolecules, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) W270–W275.

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom

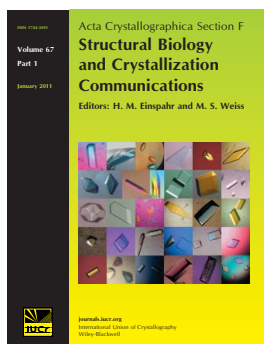
Anwar Ullah, Priscila Oliveira de Giuseppe, Mario Tyago Murakami, Dilza Trevisan-Silva, Ana Carolina Martins Wille, Daniele Chaves-Moreira, Luiza Helena Gremski, Rafael Bertoni da Silveira, Andrea Sennf-Ribeiro, Olga Meiri Chaim, Silvio Sanches Veiga and Raghuvir Krishnaswamy Arni

Acta Cryst. (2011). **F67**, 234–236

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see <http://journals.iucr.org/services/authorrights.html>



Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications is a rapid all-electronic journal, which provides a home for short communications on the crystallization and structure of biological macromolecules. It includes four categories of publication: protein structure communications; nucleic acid structure communications; structural genomics communications; and crystallization communications. Structures determined through structural genomics initiatives or from iterative studies such as those used in the pharmaceutical industry are particularly welcomed. *Section F* is essential for all those interested in structural biology including molecular biologists, biochemists, crystallization specialists, structural biologists, biophysicists, pharmacologists and other life scientists.

Crystallography Journals **Online** is available from journals.iucr.org

Anwar Ullah,^a Priscila Oliveira de Giuseppe,^b Mario Tyago Murakami,^b Dilza Trevisan-Silva,^c Ana Carolina Martins Wille,^{c,d} Daniele Chaves-Moreira,^c Luiza Helena Gremski,^c Rafael Bertoni da Silveira,^{c,d} Andrea Sennf-Ribeiro,^c Olga Meiri Chaim,^c Silvio Sanches Veiga^c and Raghuvir Krishnaswamy Arni^{a*}

^aCentro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil, ^bLaboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 13083-970 Campinas-SP, Brazil,

^cDepartamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, 81531-960 Curitiba-PR, Brazil, and

^dDepartamento de Biologia Estrutural, Biologia Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 84030-900 Ponta Grossa-PR, Brazil

Correspondence e-mail: arni@sjrp.unesp.br

Received 14 October 2010

Accepted 4 December 2010



© 2011 International Union of Crystallography
All rights reserved

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom

Phospholipases D are the major dermonecrotic component of *Loxosceles* venom and catalyze the hydrolysis of phospholipids, resulting in the formation of lipid mediators such as ceramide-1-phosphate and lysophosphatidic acid which can induce pathological and biological responses. Phospholipases D can be classified into two classes depending on their catalytic efficiency and the presence of an additional disulfide bridge. In this work, both wild-type and H12A-mutant forms of the class II phospholipase D from *L. intermedia* venom were crystallized. Wild-type and H12A-mutant crystals were grown under very similar conditions using PEG 200 as a precipitant and belonged to space group *P*12₁1, with unit-cell parameters *a* = 50.1, *b* = 49.5, *c* = 56.5 Å, β = 105.9°. Wild-type and H12A-mutant crystals diffracted to maximum resolutions of 1.95 and 1.60 Å, respectively.

1. Introduction

Envenomation by members of the genus *Loxosceles* (brown spiders), considered to be the most dangerous form of arachnidism, is a serious public health problem in both North and South America (Santi Ferrara *et al.*, 2009). *Loxosceles* venom can cause local dermonecrosis with gravitational spreading and systemic manifestations such as thrombocytopaenia, haemolysis and acute renal failure that can lead to death (Futrell, 1992; da Silva *et al.*, 2004).

Several toxic proteins present in *Loxosceles* spp. venoms have been identified and biochemically characterized (da Silva *et al.*, 2004; Gremski *et al.*, 2010). Members of the phospholipase D family are abundant in the venoms of several *Loxosceles* spp. and contribute significantly to the typical response after envenomation (Kalapothakis *et al.*, 2007; Sennf-Ribeiro *et al.*, 2008).

Phospholipases D (30–35 kDa), also referred to as dermonecrotic toxins, catalyze the hydrolysis of sphingomyelin and (lyso) glycerophospholipids, resulting in the formation of bioactive mediators such as ceramide-1-phosphate and lysophosphatidic acid which play a role in several pathological and biological responses (Van Meeteren *et al.*, 2004; Moolenaar *et al.*, 2004; Lee & Lynch, 2005). As proposed by Murakami *et al.* (2006), spider-venom phospholipases D can be classified into two classes. Members of class I possess a single disulfide bridge and contain an extended hydrophobic loop, whereas class II proteins contain an additional intra-chain disulfide bridge and display decreased catalytic activity towards phospholipids. To date, only the phospholipase D from *L. laeta* venom, a member of class I, has been structurally characterized (Murakami *et al.*, 2005), despite the clinical importance of phospholipases D in loxoscelism. Based on its crystal structure, an acid–base catalytic mechanism was proposed in which His12 and His47 play key roles and are supported by a network of hydrogen bonds between Asp34, Asp52, Trp230, Asp233 and Asn252 (Murakami *et al.*, 2005).

The recombinant dermonecrotic toxin (LiRecDT1) obtained from a cDNA library of the *L. intermedia* venom gland is able to directly induce renal injuries in mice and the haemolysis of human erythrocytes *in vitro*, suggesting that this protein is directly involved in the

the nephrotoxicity and haematological disturbances evoked during envenomation by *Loxosceles* spiders (Chaim *et al.*, 2006; Chaves-Moreira *et al.*, 2009). Mutation of the catalytic residue His12 to Ala abolishes both the nephrotoxic effect of LiRecDT1 in mice and the haemolysis of human erythrocytes (Kusma *et al.*, 2008; Chaves-Moreira *et al.*, 2009).

The present report describes the crystallization and preliminary crystallographic analysis of recombinant wild-type (LiRecDT1) and mutant (LiRecDT1 H12A) dermonecrotic toxin from *L. intermedia* venom, which belongs to the class II phospholipases D. The structural characterization of LiRecDT1 will be essential to shed light on the structural determinants of the functional differentiation between members of the class I and class II phospholipases D.

2. Materials and methods

2.1. Expression and purification

DNA corresponding to the wild-type (LiRecDT1) and mutated (LiRecDT1 H12A) forms of the mature phospholipase D was cloned into pET-14b vector (Novagen, Madison, USA) as described by Chaim *et al.* (2006) and Kusma *et al.* (2008). Both recombinant constructs were expressed as fusion proteins with a 6×His tag at the N-terminus and a 13-amino-acid linker including a thrombin site between the 6×His tag and the mature protein. pET-14b/*L. intermedia* cDNA constructs were transformed into One Shot *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS competent cells (Invitrogen) and plated on LB agar plates containing 100 mg ml⁻¹ ampicillin and 34 mg ml⁻¹ chloramphenicol. A single colony was inoculated into 50 ml LB broth (plus antibiotics) and allowed to grow overnight at 310 K. A 10 ml

portion of this overnight culture was grown in 1 l LB broth/ampicillin/chloramphenicol at 310 K until the OD at 550 nm reached 0.5. IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) was added to a final concentration of 0.05 mM and the culture was induced by incubation for an additional 3.5 h at 303 K. Cells were harvested by centrifugation (400g, 7 min) and the pellet was frozen at 253 K overnight.

The cell suspensions were thawed and were additionally disrupted by six 10 s cycles of sonication at low intensity. The lysed materials were centrifuged (20 000g, 20 min) and the supernatants were incubated with 1 ml Ni²⁺-NTA agarose beads for 1 h at 277 K (with gentle agitation). The suspensions were loaded onto a column and the packed gel was exhaustively washed with 50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole until the OD at 280 nm reached 0.01. The recombinant proteins were eluted with 10 ml elution buffer (50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole) and 1 ml fractions were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions (Fig. 1). The fractions were pooled and dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS). Site-directed mutagenesis did not alter the correct folding of the brown spider phospholipase D as assessed by circular-dichroism and fluorescence experiments (results not shown).

2.2. Crystallization

The wild-type and mutant proteins were initially crystallized by vapour diffusion in sitting drops using a Cartesian HoneyBee 963 system (Genomic Solutions) at 291 K. For initial screening, 1 µl protein solution at a concentration of 17 mg ml⁻¹ for the wild type and of 9 mg ml⁻¹ for the H12A mutant was mixed with 1 µl screening solution and equilibrated over a reservoir containing 100 µl of the latter solution. Small crystals of wild-type LiRecDT1 were observed in the condition 0.1 M Tris-HCl pH 8, 35% (v/v) PEG 200, which was refined by varying the PEG 200 concentration *versus* the pH using the hanging-drop method. The best wild-type LiRecDT1 crystals were observed in drops consisting of 2 µl protein solution (17 mg ml⁻¹) and 2 µl reservoir solution equilibrated over 1 ml reservoir solution [0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 40% (v/v) PEG 200] (Fig. 2a). Crystals of the H12A mutant were grown in a very similar condition consisting of 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 and 35% (v/v) PEG 200 (Fig. 2b).

2.3. X-ray diffraction analysis

LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A crystals were directly flash-cooled in a 100 K nitrogen-gas stream. X-ray diffraction data were collected on the W01B-MX2 beamline at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (Campinas, Brazil). The LiRecDT1 crystal was exposed for 60 s per 2° rotation in ϕ with the crystal-to-detector distance set to 100 mm. The LiRecDT1 H12A crystal was exposed for 20 s per 1° rotation in ϕ with the crystal-to-detector set to 69 mm. A total of 180 and 300 images were collected from the LiRecDT1 and the LiRecDT1 H12A crystals, respectively. The data were indexed,

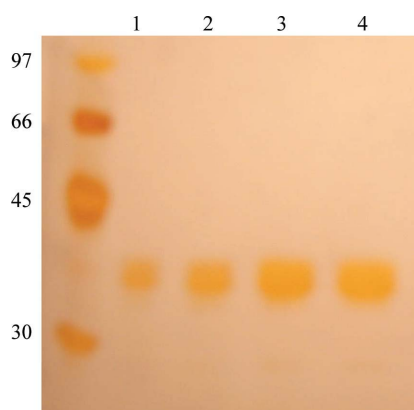


Figure 1
Silver-stained SDS-PAGE (12%) of purified samples of wild-type and H12A-mutant dermonecrotic toxin from *L. intermedia*. Lane 1, molecular-weight markers (kDa); lanes 2 and 4, purified LiRecDT1 (18 and 34 µg, respectively); lanes 3 and 5, purified LiRecDT1 H12A (18 and 34 µg, respectively).

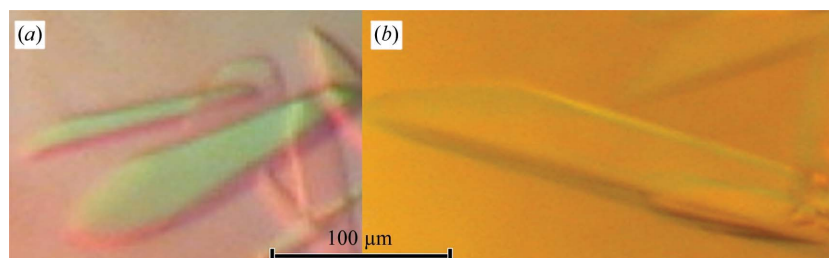


Figure 2
Microphotograph of crystals of (a) wild-type and (b) mutant dermonecrotic toxin from *L. intermedia*.

Table 1

Data-collection statistics.

Values in parentheses are for the last resolution shell.

	LiRecDT1	LiRecDT1 H12A
Data collection		
Temperature (K)	100	100
Radiation source	Brazilian Synchrotron Light Laboratory	Brazilian Synchrotron Light Laboratory
Beamline	W01B-MX2	W01B-MX2
Wavelength (Å)	1.458	1.458
Detector	MAR Mosaic 225 mm	MAR Mosaic 225 mm
Space group	<i>P</i> 12 ₁ 1	<i>P</i> 12 ₁ 1
Unit-cell parameters (Å, °)	<i>a</i> = 50.08, <i>b</i> = 49.43, <i>c</i> = 56.59, β = 105.88	<i>a</i> = 49.58, <i>b</i> = 49.46, <i>c</i> = 56.40, β = 105.56
Resolution range (Å)	30.0–2.0 (2.07–2.00)	30.0–1.60 (1.66–1.60)
<i>R</i> _{merge} (%)†	12.1 (49.4)	7.3 (37.0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	9.3 (2.4)	19.5 (2.9)
Data completeness (%)	99.5 (98.1)	98.9 (92.4)
No. of unique reflections	18148 (1765)	34632 (3241)
Multiplicity	3.1 (2.7)	5.1 (3.3)
Data analysis		
<i>V</i> _M (Å ³ Da ^{−1})	2.25	2.22
Solvent content (%)	45.25	44.63
Molecules per asymmetric unit	1	1

† $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $I_i(hkl)$ is the *i*th observation of reflection *hkl* and $\langle I(hkl) \rangle$ is the weighted average intensity for all observations *I* of reflection *hkl*.

integrated and scaled using the *DENZO* and *SCALEPACK* programs from the *HKL-2000* package (Otwinowski & Minor, 1997). Data-processing statistics are summarized in Table 1.

3. Results and discussion

LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A crystals diffracted to resolutions of 1.95 and 1.60 Å, respectively. Although the mutant protein crystal diffracted better than the native protein crystal, the H12A mutation did not alter the crystal packing or the unit-cell symmetry and parameters. The LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A data sets were indexed in the monoclinic crystal system. The presence of systematic absences indicated that the crystals belonged to space group *P*12₁1. Both crystals possessed highly similar unit-cell parameters (Table 1). The Matthews coefficient calculated for the LiRecDT1 crystal was 2.25 Å³ Da^{−1}, corresponding to a solvent content of 45% (Matthews, 1968). Considering the molecular weight of 30 000 Da, one molecule is present in the asymmetric unit of both crystals. Data-processing statistics for both data sets are presented in Table 1.

The atomic coordinates of the phospholipase D from *L. laeta* venom (PDB code 1xx1; Murakami *et al.*, 2005), which displays a sequence identity of 58% with LiRecDT1, were used to generate a search model and molecular-replacement calculations were carried out using the program *MOLREP* in the resolution range 15.0–3.0 Å (Vagin & Teplyakov, 2010). A solution was obtained for one molecule in the asymmetric unit in space group *P*12₁1. Analysis of the packing

contacts and steric clashes clearly showed that this was the correct solution. *REFMAC5* (Murshudov *et al.*, 1997) was used for rigid-body refinement of this solution in the resolution range 30.0–1.95 Å (excluding 5% of reflections for *R*_{free} calculations), resulting in a correlation coefficient of 49.2, a score of 0.675 (the score of the next highest peak was 0.338) and an *R* factor of 45.6% (*R*_{free} = 49.1%). Structure refinement and analysis are currently in progress. Determination of the LiRecDT1 H12A crystal structure will be performed using the final model of wild-type LiRecDT1.

This work was supported by grants from Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, TWAS, FAPESP, CNPq and CAPES-Brazil.

References

- Chaim, O. M., Sade, Y. B., da Silveira, R. B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez-Olortegui, C., Mangili, O. C., Gremski, W., von Dietrich, C. P., Nader, H. B. & Veiga, S. S. (2006). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **211**, 64–77.
- Chaves-Moreira, D., Chaim, O. M., Sade, Y. B., Paludo, K. C., Gremski, L. H., Donatti, L., de Moura, J., Mangili, O. C., Gremski, W., da Silveira, R. B., Senff-Ribeiro, A. & Veiga, S. S. (2009). *J. Cell. Biochem.* **107**, 655–666.
- da Silva, P. H., da Silveira, R. B., Appel, M. H., Mangili, O. C., Grewski, W. & Veiga, S. S. (2004). *Toxicol.* **44**, 693–709.
- Futrell, J. M. (1992). *Am. J. Med. Sci.* **304**, 261–267.
- Gremski, L. H., da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Probst, C. M., Ferrer, V. P., Nowatzki, J., Weinschutz, H. C., Madeira, H. M., Gremski, W., Nader, H. B., Senff-Ribeiro, A. & Veiga, S. S. (2010). *Mol. Biosyst.* **6**, 2403–2416.
- Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Gonçalves-Dornelas, H., de Castro, C. S., Silvestre, F. G., Laborne, F. V., de Moura, J. F., Veiga, S. S., Chávez-Olortegui, C., Granier, C. & Barbaro, K. C. (2007). *Toxicol.* **50**, 938–946.
- Kusma, J., Chaim, O. M., Wille, A. C., Ferrer, V. P., Sade, Y. B., Donatti, L., Gremski, W., Mangili, O. C. & Veiga, S. S. (2008). *Biochimie*, **90**, 1722–1736.
- Lee, S. & Lynch, K. R. (2005). *Biochem. J.* **391**, 317–323.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Meeteren, L. A. van, Frederiks, F., Giepmans, B. N., Pedrosa, M. F., Billington, S. J., Jost, B. H., Tambourgi, D. V. & Moolenaar, W. H. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 10833–10836.
- Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A. & Giepmans, B. N. (2004). *Bioessays*, **26**, 870–881.
- Murakami, M. T., Fernandes-Pedrosa, M. F., de Andrade, S. A., Gabdoulkhakov, A., Betzel, C., Tambourgi, D. V. & Arni, R. K. (2006). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 323–329.
- Murakami, M. T., Fernandes-Pedrosa, M. F., Tambourgi, D. V. & Arni, R. K. (2005). *J. Biol. Chem.* **280**, 13658–13664.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). *Acta Cryst.* **D53**, 240–255.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Santi Ferrara, G. I. de, Fernandes-Pedrosa, M. F., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Portaro, F. C. V., Manzoni-de-Almeida, D. M., Murakami, M. T., Arni, R. K., van den Berg, C. W., Ho, P. L. & Tambourgi, D. V. (2009). *Toxicol.* **53**, 743–753.
- Senff-Ribeiro, A., Henrique da Silva, P., Chaim, O. M., Gremski, L. H., Paludo, K. S., Bertoni da Silveira, R., Gremski, W., Mangili, O. C. & Veiga, S. S. (2008). *Biotechnol. Adv.* **26**, 210–218.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 22–25.

Review

Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes

Olga Meiri Chaim¹, Dilza Trevisan-Silva¹, Daniele Chaves-Moreira¹, Ana Carolina M. Wille^{1,2}, Valéria Pereira Ferrer¹, Fernando Hitomi Matsubara¹, Oldemir Carlos Mangili³, Rafael Bertoni da Silveira², Luiza Helena Gremski¹, Waldemiro Gremski^{1,4}, Andrea Senff-Ribeiro¹ and Silvio Sanches Veiga^{1,*}

¹ Department of Cell Biology, Federal University of Paraná CEP 81531-980 Curitiba, Paraná Brazil; E-Mails: olgachaim@ufpr.br (O.M.C.); dilzatrevisan@gmail.com (D.T.-S); dani_chaves@ufpr.br (D.C.-M); anacarolina.wille@yahoo.com.br (A.C.M.W.); valpf@ufpr.br (V.P.F.); fernando_matsubara@hotmail.com (F.H.M.); luiza_hg@yahoo.com.br (L.H.G.); senffribeiro@ufpr.br (A.S.-R)

² Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, CEP 84030-900 Ponta Grossa, Paraná Brazil; E-Mail: rafaelbertoni@uepg.br

³ Pelé Pequeno Príncipe Research Institute, CEP 80250-060 Curitiba, Paraná Brazil; E-Mail: oldcar25@yahoo.com.br

⁴ Catholic University of Paraná Health and Biological Sciences Institute, CEP 80215-901 Curitiba, Paraná Brazil; E-Mail: w.gremski@pucpr.br

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: veigass@ufpr.br; Tel.: +55-41-33611776; Fax: +55-41-3266-2042.

Received: 21 December 2010; in revised form: 26 February 2011 / Accepted: 17 March 2011 / Published: 22 March 2011

Abstract: Venomous animals use their venoms as tools for defense or predation. These venoms are complex mixtures, mainly enriched of proteic toxins or peptides with several, and different, biological activities. In general, spider venom is rich in biologically active molecules that are useful in experimental protocols for pharmacology, biochemistry, cell biology and immunology, as well as putative tools for biotechnology and industries. Spider venoms have recently garnered much attention from several research groups worldwide. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom is enriched in low molecular mass proteins (5–40 kDa). Although their venom is produced in minute volumes (a few microliters), and contain only tens of micrograms of protein, the use of techniques based on molecular biology and proteomic analysis has afforded rational projects in the area and permitted the

discovery and identification of a great number of novel toxins. The brown spider phospholipase-D family is undoubtedly the most investigated and characterized, although other important toxins, such as low molecular mass insecticidal peptides, metalloproteases and hyaluronidases have also been identified and featured in literature. The molecular pathways of the action of these toxins have been reported and brought new insights in the field of biotechnology. Herein, we shall see how recent reports describing discoveries in the area of brown spider venom have expanded biotechnological uses of molecules identified in these venoms, with special emphasis on the construction of a cDNA library for venom glands, transcriptome analysis, proteomic projects, recombinant expression of different proteic toxins, and finally structural descriptions based on crystallography of toxins.

Keywords: *Loxosceles*; brown spider; venom; recombinant toxins; biotechnological applications

1. The Spiders of Genus *Loxosceles* and Loxoscelism

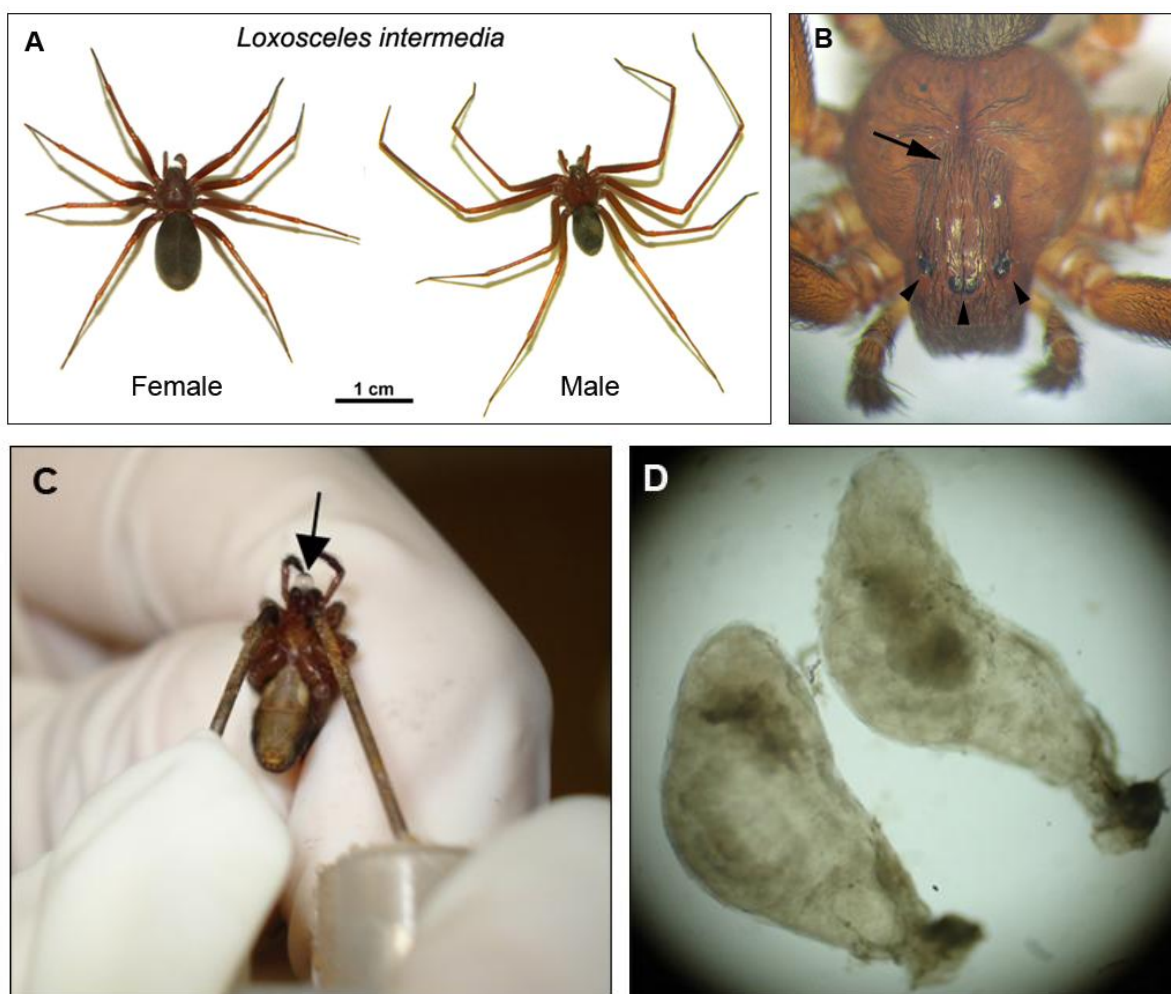
The spiders of the *Loxosceles* genus, commonly denoted as brown spiders, belong to the family Sicariidae, sub-order Labidognatha, order Araneida, class Arachnida, and phylo Arthropoda [1,2]. The Sicariidae family also comprises the spiders of *Sicarius* genus. Strong evidences show that the genera *Loxosceles* and *Sicarius* are old, having originated from a common sicariid ancestor and diversified on Western Gondwana, before the separation of the African and South American continents. Both sicariid genera are diverse in Africa and South/Central America. *Loxosceles* spiders are also distributed in North America and the West Indies, and have species described from Mediterranean Europe and China. Apparently African and South American *Sicarius* have a common ancestor and South African *Loxosceles* are derived from this group. New World *Loxosceles* also have a common ancestor and fossil data is consistent with the hypothesis of North America colonization by South American *Loxosceles* via a land bridge predating the modern Isthmus of Panama [3].

The color of spiders of this genus ranges from a fawn to dark brown (Figure 1A). *Loxosceles* spiders have a violin-shaped pattern on the dorsal surface of their cephalothorax, vary in length from 1 cm to 5 cm, including legs, and have six eyes arranged in non-touching pairs in a U-shaped pattern (Figure 1B). This positioning of eyes has been described as the best means of identifying these brown spiders [4–8]. The brown spiders are sedentary, non-aggressive, have nocturnal habits and prefer to inhabit dark areas. In human habitats, brown spiders are often found behind furniture, pictures and associated with clothes.

Accidents involving *Loxosceles* genus spiders occur mainly in the warmest months of the year, predominantly during spring and summer [4,6]. The condition caused by brown spiders, categorized as Loxoscelism, is associated with a series of clinical symptoms including cutaneous lesions, which spread gravitationally from the spider bite. The lesions are characterized by necrotizing wounds that are dark blue-violet in color and become indurated, leading to the formation of scar tissue. Surrounding the lesion, there is also erythema and edema. At the systemic level (less frequent than the appearance of skin lesions), patients may experience fever, weakness, vomiting, pruritic reactions, renal failure,

and hematologic disturbances that may include thrombocytopenia, disseminated intravascular coagulation and hemolytic anemia [5,6,8,9].

Figure 1. Brown spider aspects. (A) *Loxosceles intermedia* adult specimens—female and male. (B) Violin-shaped pattern (arrow) on the dorsal surface of cephalothorax from *Loxosceles intermedia* adult spider, and its six eyes arranged in pairs as a semi-circle (arrowheads). (C) Venom harvesting by electric shock applied to the cephalothorax. Arrow points for a drop of *Loxosceles intermedia* venom. Briefly, venom is extracted using an electric shock of 15 V applied to the cephalothorax of the spider and the venom from the tips of the fang is collected and diluted in phosphate buffered saline (PBS) or dried and stored at -80°C until use. (D) Brown spider venom glands of *Loxosceles intermedia* observed by stereo dissecting microscope (40X). Venom can be harvested directly from venom glands: the removed glands are washed in PBS and the venom is obtained by gentle compression of the glands.



2. The *Loxosceles* Venoms

Over recent years, *Loxosceles* genus spider venoms have been studied by several scientific research groups worldwide, and many different toxins have been identified in the venoms. The corresponding biological and biochemical properties of these toxins have been reported, yielding insights into the pathophysiology of envenomation [4,5,7]. The venom of *Loxosceles* spiders is a complex mixture of protein and peptide toxins with a molecular mass profile ranging from 1 to 40 kDa [5]. To date, several molecules in the *Loxosceles* spider crude venoms have been described, including alkaline phosphatase [5,10], 5'-ribonucleotide phosphohydrolase [5], sulfated nucleosides [11], hyaluronidase [5,12–14], fosfolipases-D [5,15–17], metalloproteases, serine proteases [12,13,18–22] and insecticide toxins [23]. Table 1 contains a brief collection of main features from proteic toxins described in *Loxosceles* genus.

Low molecular weight components, such as neurotoxic and non-neurotoxic peptides, polyamines and other components are poorly studied in *Loxosceles* venom. Using NMR-spectroscopy, Schroeder and colleagues (2008) showed that sulfated guanosine derivatives comprise the major small-molecule components of the brown recluse spider. They detected cross-peaks corresponding to 2,5-disulfated guanosine and 2-sulfated guanosine. It appears that sulfated nucleosides occur in several spider superfamilies, such as Agelenoidea and Amaurobioidea. The physiological properties of the sulfated nucleosides remain largely unexplored [11].

Serine proteases were already described in *Loxosceles* venom as high molecular weight enzymes (85–95 kDa) with gelatinolytic activity activated by trypsin [19]. Proteome and transcriptome analyses of *Loxosceles* venom also described this family of proteases [24,25]. Serine proteases generally are among the best characterized venom enzymes affecting the hemostatic system. However, the exact role of serine proteases in envenomation still remains to be clarified.

Recently, by using a cDNA library and transcriptome analysis, a novel expression profile has been elaborated for *Loxosceles intermedia* gland venom. This recently developed profile has allowed the identification of additional toxins as components of the venom, including insecticidal peptides similar to knottins (molecules that form an inhibitor cystin knot), astacin-like metalloproteases, venom allergen, a translationally controlled tumor protein family member (TCTP), serine protease inhibitors, and neurotoxins similar to Magi 3 [26,27]. Brown spider venoms display a broad diversity of toxin isoforms, including members of the phospholipase-D family and astacin-like toxins, even in the same sample [17,27–29]. Such features, which represent an adaptation to increase the survival of the spiders and the effectiveness of venoms, confer advantages to the spider predator. To confirm the existence of a new family of toxin isoforms, it is necessary to further characterize their biological properties. Recently, a spider toxin database called Arachnoserver which was manually curated [30], has cataloged 54 toxins from Sicariidae spiders family. It was elaborated, based on information gleaned through studies on complex venom mixtures, and has resulted in an exponential increase in the identification of peptide-toxins. King *et al.* [31] recommend a rational nomenclature for naming toxins from spiders and other venomous animals to avoid the continued use of *ad hoc* naming schemes that introduce confusion and make it difficult to compare toxins among species and establish evolutionary relationships.

Table 1. An overview of toxin families in *Loxosceles* genus.

Toxins	MW (kDa)	Characteristics and actions described	No. Seq *
Phospholipases-D (SicTox family members, such as LiRecDTs)	30–35	Several isoforms with variant features such as: - Dermonecrosis [12,13,16,32–38] - Lipids hydrolysis [33,39–42] - Hemolysis [38,43–45] - <i>In vitro</i> platelet aggregation [34,36,37] - Infiltration of inflammatory cells [35–37,42] - Edema [34,38] - Renal disturbances [35,46] - Lethality [34,38,46,47] - <i>In vitro</i> cytotoxicity [35,42,46] - Cytokine activation [41,48–50]	335
Insecticidal peptides	5–8	- LiTx family members [23,27] and Magi 3-related peptides [23,27,51] - LiTx: Lethal to <i>S. frugiperda</i> (flaccid paralysis) [23] - LiTx3: appears to act upon Na ⁺ channels [23]	8
Metalloproteases	28–35	- Astacin-like Metalloprotease (LALPs) [29,52] - Present in the venom of different species of <i>Loxosceles</i> genus [12,13,27,51,53] - Activity upon gelatin, fibronectin, fibrinogen and entactin [18,52–54]	4
Hyaluronidases	41–43	- Classified as endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases [14] - Activity upon hyaluronic acid and chondroitin sulphate [13,14] - Present in the venom of different species of <i>Loxosceles</i> genus [12–14,24,27,51,55]	-
Serine-proteases	85–95	- Gelatinolytic activity [19] - Activated <i>in vitro</i> by trypsin [19] - Present in the venom of <i>L. intermedia</i> and <i>L. laeta</i> [27,51]	-
Serine/Cysteine protease inhibitors	N.D.	- Belongs to Serpin superfamily [27] - Identified in <i>Loxosceles</i> spp. transcriptomes and proteome [24,27,51] - May be related to coagulation processes, fibrinolysis and inflammation [51]	-

Table 1. Cont.

TCTP (translationally controlled tumour protein)	~46	- Identified in <i>Loxosceles</i> spp. transcriptomes [27,51] - Putative functions: Histamine releasing factor in extracellular environment; several intracellular roles such as embryonic development, cell proliferation, stabilization of microtubules [56]	-
Lectin-like	N.D.	- Putative features: carbohydrate-binding molecules; involved in extracellular matrix organization, endocytosis, complement activation, etc. [51]	-
Alkaline-phosphatase	N.D.	- Degrades the synthetic substrate <i>p-nitrophenyl phosphate</i> [10]	-
ATPase	N.D.	- ATP hydrolysis [10]	-

N.D.: not determined. *Number of sequences deposited in PUBMED protein database.

3. The Rational Use of Venom Toxins as Biotechnological Tools

The idea of using venom toxins as tools for biological purposes is currently gaining acceptance worldwide, as researchers incorporate the use of novel technologies to overcome old obstacles such as low venom volumes. Technological advancement has led to better techniques for protein purification; different models for synthesis of recombinant toxins; structural views of molecular domains, binding sites or catalytic sites of molecules of interest; design of synthetic inhibitors or agonists; and finally, cellular and animal models for testing the products obtained. The use of toxins directly as a source of materials to produce medicines or similar products has been receiving much attention from the pharmaceutical industry and experts in the field of applied research. Examples of toxin-derived biomedicines derived from venoms of different animals are abundant. Venoms from snakes, perhaps the best studied example of biotechnological applications among animal venoms, with biologically active toxins in the cardiovascular system, central nervous system, membrane lipids and proteins, hemostatic system, and muscular system, have led to the discovering of several products used in the treatment of various diseases. These drugs include Captopril (blood pressure), Integrilin (acute coronary syndrome), Aggrastat (myocardial infarct and ischemia), Ancrod (stroke), Defibrase (acute cerebral infarction and angina pectoris), Hemocoagulase (hemorrhage), and Exanta (anti-coagulant). Toxin-derived products from snake venoms have also been used for diagnosis. This group of compounds includes Protac (protein C activator, diagnosis of hemostatic disorders), Reptilase (diagnosis of blood coagulation disorder) and Ecarin (diagnostic of hemostatic disorder) (for review, see [57,58]).

Other toxin-derived medicines have been prepared from components of marine cone snail venoms, called conotoxins, which are potent ion channel modulators, and have facilitated the discovery of a novel analgesic agent named ziconide, used in the treatment of pain syndromes [59,60]. The honeybee venom toxin, called tertiapin (TPN), is an inhibitor of potassium channels, has generated TPNLQ, a variant and a potential novel model for the treatment of hypertension [61]. Exenatide (synthetic exendin-4) is a toxin-derived medicine from the venom of Gila monster lizard that stimulates the

production of insulin by pancreatic cells and has the potential to treat type 2 diabetes [62,63]. Scorpion venom toxins have been studied as well, and a large number of molecules with biological activities as pain-killers, agents that control the spread of cancer, and natural insecticides can be generated. Scorpion venom, such as kurtosin and anuroctoxin, can target specific mammalian cell ion channels and their isolation has opened possibilities for drug design in the context of neurologic and autoimmune diseases [64,65]. Other scorpion venom toxins (beta-toxins) can selectively interact with insect voltage-gated sodium channels and can be used as toxin-based pesticides [66]. Sea anemone venom toxins have been reported as potential agents for the treatment of autoimmune diseases such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and type I diabetes [67]. These toxins, such as Shk, a 35-residue polypeptide toxin that is a potassium channel blocker, have proven to be very useful sources of pharmacological tools. Furthermore, the molecule's analogs have been evaluated with regard to the development of new biopharmaceuticals for autoimmune disorders [68,69].

With regard to spider venoms, researchers are involved in the study of insecticidal toxins, which can be used as tools in the elaboration of environmentally safe pesticides. Notably, the venom of the Australian funnel web spider has been analyzed, with emphasis on the toxin omega-atracotoxin (ALTX) HV1, a 37-residue peptide molecule. One model proposes the use of baculoviruses to express spider toxin to act as a pesticide [59,70]. Additionally, spider venom toxins can be used as models for the development of transgenic plants expressing insecticidal toxins. One example of this situation is the case of omega-ACTH-Hvt1 toxin from the venom of *Hadronyche versuta*, which protects the tobacco plant against insects. Another rational use of spider venom toxin as a model for design of therapeutic agents involves use of the toxin from *Phoneutria nigriventer* venom as a tool for the treatment of erectile dysfunction. The toxin Tx2–6 causes an improvement in the level of nitric oxide in penile tissue in rats [71,72]. Additionally, antibacterial peptides were identified in the venom of the *Cupiennius salei* spider. These peptides appear to act as channel-forming toxins within the bacteria wall. Analogous synthetic molecules would be expected to have great potential, especially in the age of multiple-antibiotic-resistant bacteria and related threats to human health [59,73].

The biotechnological uses of *Loxosceles* spider venoms have received increased attention over recent years. Notably, a spider toxin-derived product (ARACHnase) was proposed for the diagnosis of lupus anticoagulant. Also, antisera produced with *Loxosceles* venom has been used as bioproducts for serum therapy after spider accidents (for more information, see [74]). Recently, several recombinant toxins from *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. boneti*, *L. gaucho*, and *L. reclusa* have been described. These include members of the phospholipase-D family [32–37,39,43], members of metalloprotease/astacin family [29,52], a member of translationally controlled tumor protein family (TCTP), a hyaluronidase, a serine protease inhibitor, a venom allergen, an insecticide toxin, member of neurotoxin/Magi 3 family, and an insecticidal toxin [75]. Recombinant molecules will not only expand our knowledge of spider biology and the pathophysiology of Loxoscelism, but as we shall discuss in the next chapters, they will also provide additional molecules for biotechnological purposes [74].

4. Phospholipase-D

Phospholipase-D is the most studied type of molecule present in the venom from *Loxosceles* species. In the general literature, these toxins are referred to as sphingomyelinase-D, due to their first

biochemical description as enzymes capable to hydrolyze sphingomyelin substrate. Based on the IUBMB recommendations, these molecules are biochemically classified as sphingomyelin phosphodiesterases D (E.C. 3.1.4.41) [5,6] Dermonecrotic toxin is a biological term widely applied by toxinologists to *Loxosceles* phospholipase-D, due to the hallmark of brown spider bites, which trigger dermonecrosis *in vivo*. Kalapothakis *et al.* [17] have organized dermonecrotic toxins of *L. intermedia* into a protein family, denoted LoxTox, by using cDNA coding sequences of several dermonecrotic/sphingomyelinase proteins from *Loxosceles intermedia*. The authors present at least six distinct groups (LoxTox 1 to 6) based on similarities among the molecules. At the present moment, Arachnoserver [30] includes 49 toxins from the *Loxosceles* genus with biological activity patterns characterized by dermonecrosis; these toxins were denoted as brown spider phospholipase-D proteins or partial sequences following the phylogenetic analyses of sicariid SMases by Bindford *et al.* [1].

The *Loxosceles* and *Sicarius* genera uniquely share the dermonecrotic venom toxin phospholipase D within the Haplogyne lineage. The most prospective evolutionary scenario for the origin of this enzyme is a single origin in the most recent ancestor of the Sicariidae family [76]. Phospholipases-D vary in molecular mass between species of North American *Loxosceles* (31–32 kDa), Old World species (32–33.5 kDa) and South American *Loxosceles* (32–35 kDa) [76]. Sphingomyelinase-D activity can be detected in all (36) *Loxosceles* and *Sicarius* species already tested. Binford and colleagues (2008) proposed to call this specific gene family *SicTox* towards a rational nomenclature. Based on Bayesian analyses they also resolved two clades of SMD genes, labeled α and β . Sequences in the α clade are exclusively from New World *Loxosceles* and *Loxosceles rufescens* and include published genes for which expression products have SMase D and dermonecrotic activity. The β clade includes paralogs from New World *Loxosceles* that have no, or reduced, SMase D and no dermonecrotic activity and also paralogs from *Sicarius*. In the context of structural position and proposed active sites [40], α and β clades differ only in conservation of key residues surrounding the apparent substrate binding pocket [3].

The pathological mechanisms of brown spider phospholipase-D have been continuously investigated, Van Meeteran [48] and Lee and Lynch [41] observed that recombinant *Loxosceles* SMaseD isoforms are able to hydrolyze lysophospholipids, generating bioactive lipid mediators such as lysophosphatidic acid (LPA). These researches extended the boundary of knowledge, which had depended upon sphingomyelin as a well-known substrate molecule. Furthermore, Lee and Lynch [41] also postulate that the term **phospholipase-D (PLD)** would more effectively represent the broad range of hydrolysable phospholipids than previously supposed to be applied for dermonecrotic toxins from *Loxosceles* genus [48]. Nomenclature of these toxins should be updated to account for the recent accumulation of knowledge regarding the biological and biochemical properties of these compounds.

The great interest of toxinologists in PLD proteins, to the neglect of other toxins present in the venom (most of them also enzymes or bioactive peptides), is due to the ability of these proteins to reproduce many effects of necrotic arachnidism or Loxoscelism. The PLDs from the *Loxosceles* genus are described as being responsible for several biological properties ascribed to whole venom, including the following: dermonecrosis, massive inflammatory response with neutrophil infiltration and complement activation, platelet aggregation, immunogenicity, edema and increased blood vessel wall permeability, hemolysis, renal failure, toxicity for several cultured cell types, and animal lethality [4,38,74,77].

Clinical investigations by Futrell [5] indicated that a dermonecrotic factor was responsible for histopathological observations resembling those of the cutaneous Arthus reaction, as observed in victims of accidents with brown spiders. Futrell [5] also reported the native toxin from *L. reclusa* (32 kDa) was an enzyme that hydrolyzes sphingomyelin and releases choline and N-acylsphingosine phosphate (or ceramide 1-phosphate). Various isoforms of phospholipase D were already reported for different species. Using SDS-PAGE analysis and chromatography methods, a range of molecular mass between 30–35 kDa was determined for PLD toxins that have hemolytic, necrotic and platelet aggregation activity, from *L. reclusa*, *L. rufescens*, *L. gaucho*, *L. laeta* and *L. intermedia* venoms [5,15,16,44,47,78,79]. Advances in proteomic studies have facilitated the description of many more PLD-related proteins in whole venom. Luciano *et al.* [80] performed two-dimensional electrophoresis and observed enriched levels of a 30-kDa molecule as well as cationic properties in *L. intermedia* whole venom, indicating the presence of several PLD-related protein spots. Furthermore, proteomic analysis of *L. gaucho* whole venom led to the identification of at least eleven PLD proteins (30–32 kDa ‘loxnecrogin’ isoforms) by Edman chemical sequencing and capillary liquid chromatography-mass spectrometry [25]. In summary, PLDs are dermonecrotic toxins that comprise a family of toxins with different related isoforms that have biological, amino acid and immunological similarities and which are found in diverse *Loxosceles* species [4,27,38,74]. This variation in phospholipase-D molecules may be due to post-translational modification and the expression of paralogous genes, since recent data demonstrate that gene duplications are frequent and that PLD genes lie in a region with high recombination within the genome [3].

Nowadays, heterologous systems based on cDNA sequences encoding mRNA transcripts from the brown spiders are a very useful tool for the production of recombinant PLD proteins (mainly in prokaryotic models). Using extracts of the venom gland, which is the tissue that is specialized for the production and secretion of venom toxins, molecular biology techniques were optimized to obtain several sequences as template for the identification, characterization and recombinant expression of PLD proteins [74].

At present, a new generation of molecules developed through cloning techniques still remains under investigation by researchers aiming to determine molecular and cell mechanisms of PLDs by biological approaches. *L. intermedia* LiD1 recombinant protein (31.4 kDa) is a sphingomyelinase D family molecule without dermonecrotic activity but with antigenic activity [32]. *L. laeta* recombinant protein (33 kDa) is a sphingomyelinase isoform able to degrade sphingomyelin [43]. *L. laeta* recombinant phospholipase-D generates lysophosphatidic acid and induces lysis of red blood cells [41]. Keratinocyte apoptosis was induced by recombinant PLD (SMaseD P2) from *L. intermedia* [81]. Global gene expression changes in fibroblast cells induced by PLD recombinant protein from *L. reclusa* (SMD) are related to components of inflammatory response, such as human cytokines, genes involved in the glycosphingolipid metabolism pathway, and proteins known to impact transcriptional regulation [49]. Six isoforms of phospholipase-D were cloned from a cDNA library of *L. intermedia* gland venom and then expressed; they were shown to have similar toxic effects to those of native venom toxins [34–38]. *L. intermedia* recombinant protein (LiRecDT1, 34 kDa) displays dermonecrotic activity and was able to directly induce nephrotoxicity in mice and cultured tubular epithelial cells [42,46]. It could also induce non-complement-dependent hemolysis *in vitro* and inflammatory response using endothelial cell membrane as target [42,45]. Nephrotoxicity and hemolysis are both toxic effects

that depend directly on catalytic enzyme activity. In the same way, LiRecDT2 (ABB69098), LiRecDT3 (ABB71184), LiRecDT4 (ABD91846), LiRecDT5 (ABD91847), and LiRecDT6 (ABO87656) were identified, cloned and characterized as PLD proteins with high similarity to each other based on sequence alignment; this similarity is due primarily to conserved amino acids at the catalytic site [34–37]. The results of this alignment corroborated with the crystal structure analysis of a dermonecrotic toxin [40] from *L. laeta*, which suggested there were conserved residues at the proposed catalytic site for SMase D. The recent transcriptome analysis of *L. intermedia* venom gland identified at least two clusters (annotated as PLD-related ESTs) as new possibilities for a novel PLD isoform in *L. intermedia* venom, adding a new group to the LoxTox family classification [17,27].

The knowledge of structural, biochemical and biological properties of PLD toxins could be employed in design studies for the development of new drugs, biopharmaceuticals, diagnostic tests and other biotechnological and industrial applications. Immunoassays using brown spider PLDs as probes have been tested [50,82] because differential diagnosis of brown spider bites can often lead to misdiagnosis [83,84]. Moreover, therapeutic serum development and vaccination have been studied to ascertain the benefits of antivenom [85,86]. Synthetic peptides designed based on PLDs toxins with specific biological/protective effects have also been utilized [87,88]. Additionally, brown spider PLDs could be employed in the development of a vaccine derived from the phospholipase-D-mutated toxin from *L. intermedia* (substitution of the Histidine12 for Alanine in the catalytic site—LiRecDT1H12A) for the immunization of people living in regions that are endemic for accidents involving *Loxosceles* spiders. This method may be useful because enzyme activity of LiRecDT1H12A is dramatically decreased and has neither hemolytic activity nor nephrotoxicity [45,46]. Another possible application for PLD is as reagent of immunodiagnostic assays for identification and quantification of phospholipase-D in the sera of patients bitten by *Loxosceles* spider because diagnosis of Loxoscelism is very controversial and is commonly based on clinical signs and symptoms [89]. Brown spider venom may be detected in hair, wound aspirates, and skin biopsy for at least seven days after inoculation [90].

PLD enzyme activity triggers the degradation of the cell membrane phospholipids, loss of membrane asymmetry, phosphatidylserine exposure and membrane reorganization [91–93]. Sphingomyelin degradation changes membrane properties, such as lipid raft organization and membrane fluidity, triggering intracellular pathways [94,95]. Phospholipid metabolites induce the release of prostaglandins, activate the complement cascade, stimulate platelet aggregation, and enhance neutrophil chemotaxis and inflammation. Brown spider PLD toxins could be used in lipid protocols for cell membrane studies related to biological effects of lipid metabolites, with emphasis on sphingolipid-derived bioactive molecules and their signaling pathways. The activity and expression of some phospholipases are increased in several human cancers, suggesting that these enzymes may have central roles in tumor development and progression [96,97]. This involvement raises the possibility of considering phospholipid metabolism as a potential target for the development of new antitumoral agents by using brown spider PLDs as a novel model for tumor cell studies.

Further studies improving the understanding of PLD catalysis are relevant not only for comprehension of phospholipases mechanisms in basic sciences, but also for related pharmaceutical and biotechnological applications [98]. The catalytic activity of brown spider PLD plays a role in the pathological activity of this toxin and therefore cannot be dismissed as a rational target for new

strategies to treat Loxoscelism. Degradation of the phospholipid head-groups by brown spider PLDs changes membrane surface potential and affects the functional properties of some cation channels. Brown spider PLDs can offer an effective pharmacological way to activate voltage-gated channels that could be useful for “channelopathy” studies [99]. Certainly, elucidation of the roles of PLDs in a variety of molecular and cell biology mechanisms might be the greatest value of brown spider PLDs as a biotechnological product, which depends on their continuous characterization with regard to the details of pathogenesis and biochemistry.

5. Hyaluronidase

Hyaluronidases are enzymes that mainly degrade hialuronic acid (HA), and which may have activity upon chondroitin, chondroitin sulfate (CS) and, to a limited extent, dermatan sulfate (DS) [14,100,101]. The hyaluronidases are a group of enzymes that are distributed widely throughout the animal kingdom. They were discovered through the observation that extracts of some tissues contained a “spreading factor”, which facilitated the diffusion of dyes and subcutaneous antiviral vaccines [102]. These enzymes are present in the venoms of multiple organisms, such as lizards, scorpions, spiders, bees, wasps, snakes and stingrays [103–105].

Hyaluronidases in venoms have been described as “spreading factors” due to their ability to degrade extracellular matrix components and to increase the diffusion of other toxins in tissues adjacent to the inoculation site [103]. Data from crystallography and X-ray diffraction suggested the evolutionary conservation of many poison hyaluronidases in a comparative study of several animal venoms [106,107]. Tan and Ponnudurai [108] reported that all venoms exhibit a wide range of hyaluronidase and protease activities. With regard to spider venoms, Kaiser [109] was the first to report hyaluronidase activity, from Brazilian *Lycosa raptoral* spiders, now known as *Phoneutria nigriventer* [110]. Shortly after that report, hyaluronidase activity was detected in the venom of European window spider *L. tredecimguttatus* and of the tarantula *D. hentzi* venom. This enzyme was isolated from the funnel web *A. robustus* and the tarantula *E. californicum* venom [111]. Spider venom hyaluronidases have been described more recently in *Lycosa godeffroy*, *Lympoma cylindrata/murina* [110] and *Cupiennius salei* [112]. The *Hipassa* genus showed similar hyaluronidase activity to that of *H. agelenoides*, *H. lycosina* and *H. partita* species [110,113]. Moreover, venom obtained from *Vitalius dubius*, a spider found in southeastern Brazil, showed high levels of hyaluronidase activity [114]. With regard to necrotizing Australian spiders, hyaluronidase activity was demonstrated in *Badumna insignis*, *Loxosceles rufescens*, and *Lampona cylindrata* [12].

In 1973, Wright *et al.* were the first to describe hyaluronidase activity in venom of the genus *Loxosceles* [55]. This work was performed with *L. reclusae* venom, and the purified enzymes, which were estimated to have molecular weights of 33 and 63 kDa by SDS-PAGE [115], exhibited activity against HA and CS types A, B, and C. The authors also showed that rabbit anti-venom inhibited the spreading effect exhibited by whole venom *in vivo* and completely inhibited hyaluronidase activity *in vitro* [55]. Young and Pincus [12], analyzing *L. reclusae* venom, described hyaluronidase activity for a protein determined to be 32.5 kDa by HA-substrate SDS-PAGE [12,115]. Barbaro *et al.* [13] studied venoms from five *Loxosceles* species of medical importance in the Americas (*L. deserta*, *L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. reclusae*).

Hyaluronidase activity was detected in all species of *Loxosceles* spider venom tested by HA zymogram. All venom samples contained an enzyme with molecular weight of approximately 44 kDa, which was able to digest HA and which may contribute to the characteristic gravitational spread of the dermonecrotic lesion in patients suffering from the effects of these venoms [13,115]. da Silveira *et al.* [14] reported that zymography showed *L. intermedia* venom included hyaluronidase molecules of 41 and 43 kDa molecular weight. The activity of these enzymes is pH-dependent, with optimal activity between 6 and 8, and was able to degrade HA in rabbit skin. Pedrosa *et al.* [51] studying *L. laeta* transcriptome found transcripts with similarity to *Bos Taurus* 'hyaluronidase' (gb|AAP55713.1): 4 clones and 1 cluster (LLAE0048C), representing 0.13% of the total sequence. In addition, hyaluronidase represents only 0.1% of all total toxin-encoding transcripts in the venom gland of *L. intermedia* [27]. This result may explain the difficulty associated with purification this enzyme from *Loxosceles* venoms. To obtain the recombinant hyaluronidase from *L. intermedia* venom, through the use of appropriate molecular biology techniques, an isoform was cloned and showed to have a theoretical molecular mass of about 46.1 kDa [75].

Hyaluronidase-mediated degradation of HA increases membrane permeability, reduces viscosity and renders tissues highly permeable to injected fluids. This degradation process is involved in bacterial pathogenesis, the spread of toxins and venoms, fertilization, and cancer progression [102]. Therefore, brown spider hyaluronidase could be used therapeutically in many fields, including orthopedics, surgery, ophthalmology, internal medicine, oncology, dermatology and gynecology [74]. There are several studies showing that hyaluronidases can be used to promote resorption of excess fluids, to increase the effectiveness of local anesthesia and to diminish tissue destruction by subcutaneous and intramuscular injection of fluids [100,102]. For example, hyaluronidase has been used to reduce the extent of tissue damage following extravasation of parental nutrition solution, electrolyte infusions, antibiotics, aminophylline, mannitol and chemotherapeutic agents, including Vinca alkaloids [116].

Additionally, recombinant human hyaluronidase (rHuPH20) has been used in chronic pain management, to improve systemic absorption and bioavailability of drugs [117–120]. In the context of cancer therapy, testicular hyaluronidase (HAase) has been added to drug regimens to improve drug penetration. In limited clinical studies, HAase has been used to enhance the efficacy of vinblastin in the treatment of malignant melanoma and Kaposi's sarcoma, among other cancers [121]. Furthermore, when the level of HA decreases under conditions in which hyaluronidase activity increases, the moisture and tension of the skin are reduced, and histamine is released from mast cells [122]. Therefore, the identification and characterization of hyaluronidase inhibitors could be relevant to the development of contraceptives, as well as anti-tumor, anti-microbial, and anti-venom, anti-wrinkle, and anti-aging agents, and allergy and inflammation suppressors [14,122–124]. Therefore, *Loxosceles* recombinant hyaluronidases are associated with numerous potential applications [27,74,125,126].

6. Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP)

Loxosceles intermedia TCTP protein was identified during an *L. intermedia* venom gland transcriptome study [27], although another spider TCTP had already been described from the venom gland of *Loxosceles laeta* by transcriptome analysis [51]. Proteins of the TCTP superfamily were first

identified in the late eighties by research groups studying translationally regulated genes. These proteins were named *translationally controlled tumor proteins* when the discovery of human cDNA was published [127]. This name was based on the protein's tumoral origin, a human mammary carcinoma, and on the observation that TCTP is regulated at the translational level. The translationally controlled tumor protein (TCTP), which was initially named P21, Q23 and P23 by three different groups and is also called HRF (histamine-releasing factor), represents a large family of proteins that are highly conserved and ubiquitous in eukaryotes [56,128].

Sequence alignment studies of TCTP sequences revealed that nearly 50% of all amino acid residues are preserved. Among species from the same genus, TCTPs are completely conserved [56]. When the TCTP sequence found in the *L. intermedia* venom gland transcriptome was compared with the one described in the venom gland of *L. laeta*, 97% similarity was observed. *L. intermedia* TCTP also presented important similarities with the other arthropod TCTPs, such as *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* from mites [27]. The scientific community's understanding of TCTP's biological function is growing. The compound possesses a wide range of functions, and different biochemical roles are currently being established [56,129].

Although TCTP participates in various biological functions, the primary physiological roles of this protein are still unknown [130]. TCTP is widely expressed in many tissues and cell types, and its protein levels are highly regulated in response to a wide range of extracellular signals and cellular conditions [56]. Interactions between TCTP and other cellular proteins have already been reported for tubulin [131], actin-F [132], the mammalian Plk [133], translation elongation factors eEF1A and eEF1Bbeta [134], Mcl-1 [135,136], TSAP6 [137], Na,K-ATPase [138], Bcl-XL [139] and Chrf [140]. Studies have already shown that TCTP is essential for embryonic development and cell proliferation in mice and *Drosophila* [141,142]. Moreover, the protein has calcium-binding activity and is capable of stabilizing microtubules, a property that may be related to a possible role of TCTP in cell cycle control, as it was also shown that TCTP interacts with a checkpoint protein (Chrf) [56,140].

Loxosceles intermedia transcriptome analysis highlighted TCTP transcript as a toxin-coding messenger due to TCTP extracellular activities already described above [27]. TCTP was described as a protein that triggers histamine release in basophil leukocytes and was therefore called 'histamine release factor' (HRF) [128]. Then, other studies reported that TCTP presents more general 'cytokine-like' activity, as it also induces the production of interleukins from basophils and eosinophils [143]. TCTP itself is induced by certain cytokines and acts as a growth factor for B-cells [144]. Studies demonstrate that TCTP triggers histamine release in basophile leukocytes by mechanisms that may be dependent on or independent of the presence of IgE. It is believed that a specific TCTP receptor may participate in the process, leading to mast cell activation [56]. Although TCTP protein was found in biological fluid of asthmatic or parasitized patients and in saliva from ticks, TCTP mRNAs do not code for a signal sequence and no precursor protein has been described [56,145]. TCTP secretion from cells proceeds via an endoplasmic reticulum/Golgi-independent or non-classical pathway, probably mediated by secreted vesicles called exosomes, which have been suggested as possible pathways for non-classical secretion [137,145]. In the case of the *Loxosceles* venom gland, TCTP is secreted via holocrine secretion [27]. TCTPs have been described in gland secretions of many arthropods, such as ixodid ticks and in the venom gland of the wolf spider [146–148].

L. intermedia TCTP is very similar to *Dermacentor variabilis* TCTP, which is expressed in diverse tissues from the tick, including its salivary gland. When this TCTP was cloned and expressed as a recombinant protein, it was able to release histamine from a basophilic cell line [27,146]. Based on these data, it is possible to suggest that *L. intermedia* TCTP may act as a histamine release factor. The presence of a component in *L. intermedia* venom related to the histaminergic activity of venom supports with this hypothesis [149]. Recently, some authors have called attention to the role of histamine and its receptors in the development of edema, involving increased vascular permeability and vasodilatation [150], which occurs in *Loxoscelism*. Histamine had been described as the principal pharmacological component in the venom of the wolf spider (*Lycosa godeffroyi*) [148,151]. Proteins of the TCTP family were described to be expressed in human parasites suggesting that could be related to the survival mechanisms of parasites in the host and to the onset of pathological processes [152–154]. The antimalarial drug artemisin [155], probably acts on *Plasmodium* TCTP, confirming its important function in the development of pathology [153,154].

Recently, an increasing number of researchers have focused their attention on the cellular and extracellular activities of TCTP, as it has been implicated in the promotion of cell growth and tumorigenesis as well as in protection against apoptosis and other consequences of cell stress [56,156–158]. TCTP protein levels are upregulated in cancer cells and in human tumors [159–161]. Downregulation of TCTP has been implicated in biological models of tumor reversion [159,162], and the protein is the target of various anticancer drugs [159,163]. TCTP has been proposed as a potential cancer biomarker [160,164,165] and therapeutic target [166].

TCTP has enormous biotechnological potential; this toxin presents a wide range of putative applications: from a biological tool at research laboratories to clinical oncology, as a biomarker and/or a model for drug design to cancer treatment. Drugs that cause inhibition of TCTP activity resulted in tumor growth inhibition both *in vitro* and *in vivo* [159]. TCTP and its biological tools (e.g., antibodies against TCTP) can also be used in experimental oncology to study tumor cell behavior and metabolism, as well as in the screening of anticancer drugs. Still in the field of cell proliferation, TCTP and its related biological tools could also be used to study cell cycle regulation and the microtubule cytoskeleton, as well as its role in cell physiology and organelle transport.

Calcium metabolism and signaling are other issues that could be explored using TCTP and its derived biological tools. Antiapoptotic activities were also described for TCTP: this protein potentiates MCL1 and BCL-X_L inhibits BAX [158]. These effects highlight TCTP as a candidate for apoptosis studies, as an apoptotic drug and as a model for anti-apoptotic reagents. Another possible application of this toxin could be its employment in allergic screening tests, due to TCTP's histaminergic activity. Inhibitors of TCTP are putative anti-histaminic drugs and other TCTP-derived biological tools could be useful at research laboratories that study histamine release, mast cell metabolism and activation, immediate hypersensitivity reactions and the allergy process in general. Protocols that involve proliferation of B cells represent other potential applications for TCTP. TCTP secretion to the extracellular milieu is mediated by a non-classical pathway involving exosomes [137]; therefore, it is a good reagent with which to study this type of cellular secretion. TCTP has a surprising number of different functions as described here, but how these different functions might be interrelated remains to be determined [167]. Therefore the putative applications suggested herein are just the first insights into the potential uses and applications of TCTP in the field of biotechnology.

7. Astacin-Like Metalloproteases

Metalloproteases in *Loxosceles* venom were first characterized in *L. intermedia* venom. Feitosa *et al.* [18] described two metalloproteases, Loxolisin A (20–28 kDa, with fibronectinolytic and fibrinogenolytic activity) and Loxolisin B (32–35 kDa, with gelatinolytic activity). Zanetti *et al.* [168] purified a 30 kDa molecule with fibrinogenolytic activity from *L. intermedia* crude venom. Furthermore, da Silveira *et al.* [53] showed that venom gland extracts from brown spiders possess proteolytic activity, and this activity could be inhibited by bivalent chelators. This study proved that metalloproteases are components of *L. intermedia* and *L. laeta* venoms, and eliminated the possibility that electrostimulated venom could have been contaminated with digestive hydrolytic enzymes during extraction [53].

Metalloproteases were also identified as components of different *Loxosceles* species venoms, such as *L. rufescens*, *L. gauchoi*, *L. laeta*, *L. deserta* and *L. reclusa* [12,13,51,168]. Recently, a recombinant metalloprotease from the *L. intermedia* venom gland, named LALP (*Loxosceles* astacin-like metalloprotease), was characterized as an astacin-like enzyme. This functional characterization supported previous data describing metalloproteases in *Loxosceles* venom [52]. The identification of LALP in *L. intermedia* venom was the first report in the literature of the presence of an astacin family member as an animal venom constituent. Trevisan-Silva *et al.* [29] described two new astacin-like toxin isoforms from *L. intermedia* venom (LALP2 and LALP3) and found that metalloproteases in *L. laeta* and *L. gauchoi* venoms are also members of the astacin family. This study described the presence of a gene family of astacin-like toxins in three *Loxosceles* species suggesting that these molecules will be found in all South America *Loxosceles* species [29]. Astacin-like proteases are the second most commonly expressed class of toxins in the *L. intermedia* venom gland, comprising 9% of all transcripts [27].

The astacin family enzymes are zinc-dependent metalloproteases, which are considered as part of the metzincin superfamily [54,169]. Members from the astacin family are ubiquitous, existing more than 200 described astacins, which are found in some bacteria species and in all animal kingdoms [169–173]. Astacins are characterized by the zinc-binding motif (**HEXXHXXGXXHEXXRXDR**), which contains three histidine residues that are responsible for the complexation of zinc. Below the active site, all astacins have a methionine residue within a typical Met-turn (**SXMX_Y**), with a tyrosine residue that might be involved in substrate fixation [54,169,174–176]. This protease family was named after the identification of astacin from freshwater crayfish, *Astacus astacus*. Astacin is the prototypical digestive collagenolytic enzyme of the astacin family [177,178]. Astacin family members are reported to have a wide range of functions, playing roles in digestion, in peptide and matrix molecules processing, in the activation of growth factors and in the degradation of distinct proteins [169,174,175].

We have little information about the biochemical and biological function of *Loxosceles* venom astacins because astacin members have distinct functions and the study of astacins from *Loxosceles* venoms is just beginning. Previous studies of *Loxosceles* metalloproteases have shown that they degrade some matrix proteins (fibronectin, fibrinogen, gelatin and entactin), but the mechanism involved in the noxious effect of the venom is until unclear [18,20,21,52]. It has been suggested that astacin toxins could be involved in gravitational spreading of dermonecrosis, in hemorrhagic

disturbances observed in accidents, imperfect platelet adhesion and increased vascular permeability, which can occur near bite sites after brown spider accidents [13,29,52]. Also, astacin proteases could act as a spreading factor for other venom toxins and could serve as important agents, in the processing of other venom toxins, by cleaving inactive proteins and generating active peptides that may be involved in *Loxoscelism* effects [29,52].

Astacin-like proteases are biologically active enzymes that have potential applications in pharmaceutical studies and could be used as tools for research protocols [74]. The enzymatic activities of astacins upon different proteins highlight these molecules as useful tools in studies involving protein degradation, especially the degradation of extracellular matrix (ECM) components. Considering the physiological and pathological events related with ECM degradation, astacins can be used in protocols for medical and pharmaceutical research, such as ECM assembly and remodeling (including collagen processing and the healing process). Drug administration (as a co-adjuvant), cell membrane metabolism, embryogenesis, cellular differentiation (including stem cells), tumorigenesis and metastasis, enzymatic activation (latency and activation of zymogens), cell signaling based on proteolysis, inflammatory response and vascular permeability are other potential applications for these molecules.

Astacins from *L. intermedia* could also be used as starting materials to design new drugs/molecules, as agonists and/or inhibitors. One possible therapeutic use of astacins from *L. intermedia* is the context of vascular diseases (acute myocardial infarction, acute ischemic stroke, thrombosed aortic aneurysms, pulmonary embolism, etc.) and as thrombolytic agents. At present, intravenously administered tissue plasminogen activator (IV-TPA) remains the only FDA-approved therapeutic agent for the treatment of ischemic stroke within three hours of symptom onset. Although intra-arterial delivery of the thrombolytic agent seems effective, various logistic constraints limit its routine use and, as yet, no lytic agent has received full regulatory approval for intra-arterial therapy [179]. Moreover, astacin inhibitors may be therapeutically useful in atherosclerosis prevention. Meprins, which are members of the astacin family, hydrolyze and inactivate several endogenous vasoactive peptides, some of which could alter various functions of cells in the arterial wall. Recent studies have shown that a meprin inhibitor suppresses the formation of atherosclerotic plaques [180]. The recombinant astacins could also be used as reagents for laboratorial tests to diagnose *Loxoscelism*, as well as anti-*loxosceles* serum production, in the treatment of envenomation.

8. Insecticidal Peptides

Spider venoms are functionally related to defense against predators and primarily used to paralyze and capture natural prey, especially insects [89,181–183]. To execute these functions, spiders developed an arsenal of insecticidal molecules in their venoms, resulting in a combinatorial peptide library of insecticidal peptides that has been improved over the course of evolution [184]. Such peptides consist of single-chain, low molecular weight molecules of 3–10 kDa, with a high number of cysteine residues that form intramolecular disulfide bridges [185,186]. Over the last decade, these peptides have been investigated extensively through identification, purification, characterization and cloning studies [23].

The insecticidal peptides act in the nervous system of prey or predator, causing paralysis or even death, by interacting with specific neuronal ion channels of the excitable membranes [183]. These peptides can be classified depending on their mode of action, such as effects on sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}), potassium (K^+) and chloride (Cl^-) ion channels [111,187]. Many of these peptides present a structural motif designated as an inhibitory cystine knot (ICK), and therefore these molecules are named *knottins*. The ICK motif is composed of a triple-stranded, anti-parallel β -sheet, stabilized by a cystine knot containing three disulphide bridges [188,189], which confer rigidity to the molecules in addition to a stabilization of their secondary structures and relative resistance to denaturation [190].

Although there are a great number of insecticidal peptides characterized in several spider species, little is known about insecticidal molecules in *Loxosceles* spiders. By studying *L. intermedia* venom, de Castro *et al.* [23] first described and characterized three isoforms of insecticidal peptides named LiTx1, LiTx2 and LiTx3 which contain ICK motif and act on specific ion channels. The chromatographic fraction containing these peptides showed potent insecticidal activity against the agricultural pests *Spodoptera* species. LiTx1 (7.4 kDa) presents some sites to possible post-translational modifications, such as N-myristoylation, protein kinase C phosphorylation, amidation and casein kinase II phosphorylation. With regard to its specificity, the study was not able to determine whether LiTx1 interacts with Na^+ or Ca^{2+} channels. LiTx2 (7.9 kDa) and may present N-myristoylation, protein kinase C phosphorylation and amidation sites. Its specificity to ion channels was not determined. LiTx3 peptide (5.6 kDa) has also sites for N-myristoylation and protein kinase C phosphorylation. Based on bioinformatic analyses, de Castro, *et al.* hypothesized that LiTx3 may interact with Na^+ channels. In 2006, a new isoform, LiTx4, was identified (GenBank n°DQ388598.1).

Transcriptome analysis of the *L. intermedia* venomous gland revealed ESTs with similarity to LiTx peptides described by de Castro *et al.* [23]. LiTx3 was the most abundant sequence in the *L. intermedia* transcriptome, comprising 32% of toxin-encoding messengers. LiTx2 had a representativeness of 11% in relation to the toxin-encoding transcripts. [27]. The transcriptome analysis of *L. intermedia* venomous gland additionally revealed the presence of another class of ion channel-binding peptides. These peptides present similarity to neurotoxin Magi 3, a peptide isolated by Corzo *et al.* [26] from the venom of the *Macrothele gigas* spider. Magi 3 peptide is able to paralyze insects, although the authors did not confirm whether Magi 3 is specific for insect sodium channels or also acts on calcium channels [191].

The specificity of insecticidal peptides for ion channels provides an important tool to understand their dynamic activity. Ion channels are transmembrane proteins involved in the control of ion fluxes across the membrane, regulating membrane potential and ion balance. Their activity is also related to the coordination of diverse cellular functions such as excitation-contraction coupling, hormone and neurotransmitter secretion and gene expression. Thus, the comprehension of the interaction between peptide-ionic channels allows a more refined investigation of the physiological role of ion channels, as well as the determination of possible therapeutic applications [192].

The ability to discriminate insect ion channels confers to insecticidal peptides with considerable potential in the development of an efficient bioinsecticide for the control of economically disadvantageous pests or insect vectors of new or re-emerging disease [182,193]. Recombinant baculovirus containing the gene encoding an insecticidal peptide has been studied and tested against many insect pests, such as *Heliothis virescens* (cotton bollworm), *Laspeyresia pomonella*

(codlingmoth) and *Neodiprion sertifer* (European sawfly) [183,194]. This biotechnological development could lead to alternative methods for chemical control, resulting in many benefits to the agricultural sector that will ultimately reduce economic losses.

9. Serine Protease Inhibitors

The control of proteases is normally achieved by the regulation of expression, secretion, activation of proenzymes and degradation. A second level of control is based on specific inhibition of activity. Despite microorganisms that produce non-proteinaceous compounds that block host proteases, the remaining all known natural protease inhibitors are proteins [195–197]. Among these natural protease inhibitors, the most extensively studied and described protein inhibitors of proteases are the group of serine protease inhibitors.

Serine protease inhibitors can be classified into one of three different types, according to their structures and the mechanism of inhibition: the canonical inhibitors, the non-canonical inhibitors and the serpins. The largest group is the canonical inhibitors, which are small proteins (14 to ~200 amino acid residues) represented mainly by the Kazal, BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor), potato I and STI (soybean trypsin inhibitor) families [198,199]. Non-canonical are usually found in blood-sucking organisms and are responsible for blocking the blood-clotting cascade [196]. Serpins (*serine protease inhibitors*) are large proteins (typically 350 to 500 amino acids in size), also widely distributed in nature, and are abundant in human plasma. Similar to the canonical inhibitors, serpins exhibit binding loops and interact with the target enzyme in a substrate-like manner. However, cleavage of the serpin loop by the protease leads to dramatic conformational changes in the global structure of the inhibitor [196,200,201].

In brown spider venom, protease inhibitors were first reported in *L. laeta* [51]. The transcriptome analysis approach, which detected 0.6% of sequences with identity to intracellular coagulation inhibitor from *Tachypleus tridentatus* and sequences with identity to serine (or cysteine) proteinase inhibitors from *Mus musculus*, *Aedes aegypti*, *Branchiostoma lanceolatum*, *Gallus gallus*, and *Boophilus microplus*. Similar results were obtained for *L. intermedia* [27], in which one transcript presented significant similarity with a serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade I, member 1 from *Mus musculus*. In both cases (*L. laeta* and *L. intermedia*), the sequences analyzed were similar to serine proteinase inhibitors belonging to the Serpin superfamily.

Playing roles as potential toxins, serine protease inhibitors have been intensively described in several snake venoms, especially for those of the *Elapidae* and *Viperidae* families [202]. In these venoms, the majority of inhibitors characterized belong to the canonical type, particularly the Kunitz/BPTI inhibitors of trypsin and chymotrypsin. The peptides were typically 6–7 kDa in size and were isolated from crude venoms and studied by different methods [203–210]. The identification of this type of molecule allowed future isolation and further characterization of putative protease inhibitors, suggesting the possibility of a biotechnological application. The best example for this purpose is Textilinin-1, which is a well-known 6.7 kDa Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the snake *Pseudonaja textilis* which binds and blocks certain proteases, including plasmin and trypsin [211]. The ability to reversibly inhibit plasmin has raised the possibility of using this drug as an alternative to aprotinin (Trasylol®), as a systemic antibleeding agent in cardiac surgery. Like

aprotinin, Textilinin-1 (in equimolar concentrations) almost completely inhibits tissue plasminogenactivator-induced fibrinolysis of whole blood clots. In mouse bleeding models, Textilin-1 shows shorter time of hemostasis compared to aprotinin and appears to be a more specific plasmin inhibitor than aprotinin [210–212].

Despite their presence in the majority of snake venoms, serine protease inhibitors have also been described and characterized in other organisms. Zhao *et al.* [213] isolated and characterized a 60 kDa serpin from skin secretions of *Bufo andrewsi*, which was denoted as Baserpin. This protein was able to irreversibly inhibit trypsin, chymotrypsin and elastase. Serine protease inhibitors are also present in spider venoms, particularly in the venom of tarantulas (*Ornithoctonus huwena* and *Ornithoctonus hainana*). The prototypic molecule in tarantula venom is HWTX-XI, 6.1 kDa peptide from *Ornithoctonus huwena* venom, which belongs to the Kunitz-type family of serine protease inhibitors. Just like Kunitz-type toxins in snake venoms, HWTX-XI is considered to be a bi-functional toxin because it is a strong trypsin inhibitor as well as a weak Kv1.1 potassium channel blocker [214].

Zhao *et al.* [213] isolated and characterized a 60 kDa serpin from skin secretions of *Bufo andrewsi*, which was denoted as Baserpin. This protein was able to irreversibly inhibit trypsin, chymotrypsin and elastase. The considerations above represent just a few insights concerning serine protease inhibitors uses and applications. The great importance of proteases in numerous different biological processes and the large number of protease inhibitors described suggest their strong biotechnological potential.

10. Conclusion

Research in brown spider venom toxins has increased over recent years, but the challenges and opportunities are enormous. To move the field forward, scientists must have access to the biodiversity of spiders within their countries. Different *Loxosceles* genus spider species are reported to inhabit every continent [5,6,8], and bureaucracy related to the capture of spiders should not be a hindrance to researchers on toxinology area. Official collaborations with groups based where brown spiders are endemic will facilitate access to their venom.

Another difficulty in working with *Loxosceles* venoms is the fact that the volume of venom is minute (just microliters, containing a few micrograms of protein, as previously discussed). This makes work difficult for researchers that use crude venom in their experiments. To overcome this difficulty, works can collect venom from hundreds, or even, thousands, of spiders during specific periods of the year when there is an abundance of spiders and store the venom under appropriate conditions (*i.e.*, lyophilized or in solutions at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) [18]. Alternatively, brown spiders could be captured from the wild and kept individually (because they kill one another) under laboratory conditions, using insect larvae as food and with periodic hydration via water-soaked cotton balls, with venom collected as necessary.

Another technical solution for venom production is the standardization of long-term primary culture of secretory cells from the venom gland and the production of venom *in vitro*. The culture of secretory cells from different venomous animals has shown promising results, and represents a good system with which to obtain toxins without capturing animals from the wild and without the related ecological disturbances. To date, several groups have reported expertise on this topic, and have established protocols for the primary culture of secretory cells. Examples include those from the venom glands of

Crotalus durissus terrificus and *Bothrops jararaca* snakes [215,216], as well as those from the venom glands of the *Phoneutria nigriventer* spider [217]. Such protocols ensure that sufficient amounts of native toxins are produced and secreted for culture medium and used for technical purposes after purification. Unfortunately, for *Loxosceles* venom gland cells, there are no reports to date of successful primary cultures of secretory cells. This situation represents a rational challenge for the future regarding the acquisition of sufficient amounts of native molecules. Finally, the venom of *Loxosceles* species is commercially available, as is the case for *L. deserta* (Sigma, St. Louis, USA).

The cDNA library construction of *L. intermedia* venom gland [35], transcriptome analysis [27,51] and the cloning and synthesis of several recombinant toxins [29,32–37,39,43,52] is helping to elucidate the biology of *Loxosceles* genus and opening possibilities for biotechnology applications. Recombinant toxins have been expressed in bacteria, simple organisms that are easy to manipulate and cheap to work with; unfortunately these do not generate co- and post-translational modifications such as disulphide bonds and protein glycosylations. Certain recombinant molecules are expressed in their unfolded form, have incorreced conformations, are water insoluble, and have no biological function.

With regard to phospholipase-D family members, these recombinant toxins purified from bacteria have biological functions compatible with those described for native toxins. For native toxins, it was already very well demonstrated that inflammatory response with cytokines release is induced at the bite site, and lipid content might be relevant for tissue damage [218,219]. These recombinant toxins induce dermonecrosis, platelet aggregation, increased vessel permeability, deep inflammatory responses, and phospholipase-D activity [34–37]. On the other hand, a great number of brown spider venom recombinant toxins synthesized by bacteria are water-insoluble and have no biological function. To surpass this technical obstacle, insoluble toxins can be refolded by methods of protein refolding [220], but the final concentration of refolded toxins obtained is generally not enough for biotechnological uses.

Alternatively, toxins can be synthesized using other expression models, such as the yeast *Pichia pastoris* [221], an organism that has subcellular organelles as endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. This yeast is able to perform co- and post-translational modifications of proteins. For *Loxosceles* toxins, preliminary experiments are underway [75], but a frequent problem to be overcome is the hyperglycosylation of secreted proteins, which alters the biological functions of the toxins. Expression in systems of insect cells, such as *Drosophila* Schneider cells, is a possible alternative method [222] because it is a eukaryotic expression system, in which proteins undergo post-translational modifications.

For *Loxosceles* toxins, again, experiments are just beginning and results are preliminary [75], but they can provide secreted toxins that are correctly folded and, in the near future, may be used as tools for biological evaluations. Baculovirus vector for protein expression in insect and mammalian system is also feasible [223], but we do not have information on *Loxosceles* molecules produced using this technique. Finally, the mammalian expression system is a rational alternative for expression of correctly folded recombinant proteins. Mammalian cells have the capacity for proper protein folding and assembly, as well as co- and post-translational modifications [224]. Currently, there are no data on *Loxosceles* venom toxins obtained using this system. However, because this model is a viable method for recombinant proteins of therapeutic use, scientists are expected to explore this system in the future.

The advancement of *Loxosceles* venom toxin research will also involve techniques from proteomic analysis. These techniques generally have high sensitivity and accuracy and normally use low venom concentration for analysis. To date, at least two works have been completed addressing this topic. By using proteomics methodologies, such as bi-dimensional electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing and mass spectrometry, eleven isoforms for phospholipase-D toxin were identified in *L. gaucho* venom [25]. In addition, through mass spectrometry analysis using *L. intermedia* crude venom, 39 proteins were identified, and putative effects for envenomation were discussed [24]. The use of combinatorial data from proteomic and molecular biology techniques, such as mass spectrometry, transcriptome analysis and cDNA library constructions, will open possibilities for the discovery of novel toxins in complex venoms [225].

Additionally, in the near future, the biotechnological use of *Loxosceles* toxins could provide information related to the tridimensional structure of identified toxins, through crystallography and X-ray diffraction and/or nuclear magnetic resonance for soluble toxins [59]. Findings in these areas will bring insight related to the molecular structure of toxins and will be very important for the discovery of catalytic sites, sites that interact with natural substrates or ligands, and from such data, synthetic ligands, analogs, or inhibitors could be designed for biotechnological purposes.

Regarding *Loxosceles* spider venom toxins, a recombinant phospholipase-D from *L. laeta* was analyzed by crystallography and X-ray diffraction. The data collected allowed description of the amino acid residues involved in catalysis and metal ion coordination important for sphingomyelinase activity [226]. Experiments using other isoforms of phospholipase-D from *L. intermedia* venom (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT6, GFP-LiRecDT1, and LiRecDT1H12A, with a mutation on the catalytic site, [46]) are currently being conducted using crystallography and X-ray diffraction. Additionally, other *Loxosceles* recombinant toxins (enzymes and peptides) could be evaluated and represent potential biological tools in a wide range of fields.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq, CAPES, Fundação Araucária-Paraná and Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná SETI-PR, Brasil.

References

1. Binford, G.J.; Bodner, M.R.; Cordes, M.H.; Baldwin, K.L.; Rynerson, M.R.; Burns, S.N.; Zobel-Thropp, P.A. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. *Mol. Biol. Evol.* **2009**, *26*, 547–566.
2. Platnick, N.I. *The World Spider Catalog*, Version. 9.0.; American Museum of Natural History: New York, NY, USA, 2008.
3. Binford, G.J.; Callahan, M.S.; Bodner, M.R.; Rynerson, M.R.; Nunez, P.B.; Ellison, C.E.; Duncan, R.P. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2008**, *49*, 538–553.
4. Appel, M.H.; Bertoni da Silveira, R.; Gremski, W.; Veiga, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. *Invertebr. Surviv. J.* **2005**, *2*, 152–158.

5. Futrell, J.M. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.* **1992**, *304*, 261–267.
6. da Silva, P.H.; da Silveira, R.B.; Appel, M.H.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* **2004**, *44*, 693–709.
7. Hogan, C.J.; Barbaro, K.C.; Winkel, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann. Emerg. Med.* **2004**, *44*, 608–624.
8. Swanson, D.L.; Vetter, R.S. Loxoscelism. *Clinics. Dermatol.* **2006**, *24*, 213–221.
9. Lung, J.M.; Mallory, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: A diagnostic challenge. *Int. J. Dermatol.* **2000**, *39*, 287–289.
10. Sales, P.B.; Santoro, M.L. Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *147*, 85–95.
11. Schroeder, F.C.; Taggi, A.E.; Gronquist, M.; Malik, R.U.; Grant, J.B.; Eisner, T.; Meinwald, J. NMR spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14283–14287.
12. Young, A.R.; Pincus, S.J., Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* **2001**, *39*, 391–400.
13. Barbaro, K.C.; Knysak, I.; Martins, R.; Hogan, C.; Winkel, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* **2005**, *45*, 489–499.
14. da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* **2007**, *49*, 758–768.
15. Barbaro, K.C.; Ferreira, M.L.; Cardoso, D.F.; Eickstedt, V.R.; Mota, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, *29*, 1491–1497.
16. Cunha, R.B.; Barbaro, K.C.; Muramatsu, D.; Portaro, F.C.; Fontes, W.; de Sousa, M.V. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucha* brown spider venom. *J. Protein Chem.* **2003**, *22*, 135–146.
17. Kalapothakis, E.; Chatzaki, M.; Goncalves-Dornelas, H.; de Castro, C.S.; Silvestre, F.G.; Laborne, F.V.; de Moura, J.F.; Veiga, S.S.; Chavez-Olortegui, C.; Granier, C.; Barbaro, K.C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. *Toxicon* **2007**, *50*, 938–946.
18. Feitosa, L.; Gremski, W.; Veiga, S.S.; Elias, M.C.; Graner, E.; Mangili, O.C.; Brentani, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* **1998**, *36*, 1039–1051.
19. Veiga, S.S.; da Silveira, R.B.; Dreyfus, J.L.; Haoach, J.; Pereira, A.M.; Mangili, O.C.; Gremski, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **2000**, *38*, 825–839.
20. Veiga, S.S.; Feitosa, L.; dos Santos, V.L.; de Souza, G.A.; Ribeiro, A.S.; Mangili, O.C.; Porcionatto, M.A.; Nader, H.B.; Dietrich, C.P.; Brentani, R.R.; Gremski, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem. J.* **2000**, *32*, 397–408.

21. Veiga, S.S.; Zanetti, V.C.; Braz, A.; Mangili, O.C.; Gremski, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2001**, *34*, 843–850.
22. Veiga, S.S.; Zanetti, V.C.; Franco, C.R.; Trindade, E.S.; Porcionatto, M.A.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B. *In vivo* and *in vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thromb. Res.* **2001**, *102*, 229–237.
23. de Castro, C.S.; Silvestre, F.G.; Araujo, S.C.; Gabriel de, M.Y.; Mangili, O.C.; Cruz, I.; Chavez-Olortegui, C.; Kalapothakis, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* **2004**, *44*, 273–280.
24. dos Santos, L.D.; Dias, N.B.; Roberto, J.; Pinto, A.S.; Palma, M.S. Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 933–943.
25. Machado, L.F.; Laugesen, S.; Botelho, E.D.; Ricart, C.A.; Fontes, W.; Barbaro, K.C.; Roepstorff, P.; Sousa, M.V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics* **2005**, *5*, 2167–2176.
26. Corzo, G.; Gilles, N.; Satake, H.; Villegas, E.; Dai, L.; Nakajima, T.; Haupt, J. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. *FEBS Lett.* **2003**, *547*, 43–50.
27. Gremski, L.H.; da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Probst, C.M.; Ferrer, V.P.; Nowatzki, J.; Weinschutz, H.C.; Madeira, H.M.; Gremski, W.; Nader, H.B.; Senff-Ribeiro, A.; Veiga, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 2403–2416.
28. Binford, G.J.; Cordes, M.H.; Wells, M.A. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon* **2005**, *45*, 547–560.
29. Trevisan-Silva, D.; Gremski, L.H.; Chaim, O.M.; da Silveira, R.B.; Meissner, G.O.; Mangili, O.C.; Barbaro, K.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S.; Senff-Ribeiro, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie* **2010**, *92*, 21–32.
30. Wood, D.L.; Miljenovic, T.; Cai, S.; Raven, R.J.; Kaas, Q.; Escoubas, P.; Herzig, V.; Wilson, D.; King, G.F., ArachnoServer: A database of protein toxins from spiders. *BMC Genomics* **2009**, *10*, 375.
31. King, G.F.; Gentz, M.C.; Escoubas, P.; Nicholson, G.M. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* **2008**, *52*, 264–276.
32. Kalapothakis, E.; Araujo, S.C.; de Castro, C.S.; Mendes, T.M.; Gomez, M.V.; Mangili, O.C.; Gubert, I.C.; Chavez-Olortegui, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* **2002**, *40*, 1691–1699.
33. Tambourgi, D.V.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; van den Berg, C.W.; Goncalves-de-Andrade, R.M.; Ferracini, M.; Paixao-Cavalcante, D.; Morgan, B.P.; Rushmere, N.K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. *Mol. Immunol.* **2004**, *41*, 831–840.

34. Appel, M.H.; da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Paludo, K.S.; Silva, D.T.; Chaves, D.M.; da Silva, P.H.; Mangili, O.C.; Senff-Ribeiro, A.; Gremski, W.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 167–178.
35. Chaim, O.M.; Sade, Y.B.; da Silveira, R.B.; Toma, L.; Kalapothakis, E.; Chavez-Olortegui, C.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; von Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *211*, 64–77.
36. da Silveira, R.B.; Pigozzo, R.B.; Chaim, O.M.; Appel, M.H.; Dreyfuss, J.L.; Toma, L.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie* **2006**, *88*, 1241–1253.
37. da Silveira, R.B.; Pigozzo, R.B.; Chaim, O.M.; Appel, M.H.; Silva, D.T.; Dreyfuss, J.L.; Toma, L.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S.; Gremski, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. *Biochimie* **2007**, *89*, 289–300.
38. Ribeiro, R.O.; Chaim, O.M.; da Silveira, R.B.; Gremski, L.H.; Sade, Y.B.; Paludo, K.S.; Senff-Ribeiro, A.; de Moura, J.; Chavez-Olortegui, C.; Gremski, W.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **2007**, *50*, 1162–1174.
39. Ramos-Cerrillo, B.; Olvera, A.; Odell, G.V.; Zamudio, F.; Paniagua-Solis, J.; Alagon, A.; Stock, R.P. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* **2004**, *44*, 507–514.
40. Murakami, M.T.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; de Andrade, S.A.; Gabdoulkhakov, A.; Betzel, C.; Tambourgi, D.V.; Arni, R.K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *342*, 323–329.
41. Lee, S.; Lynch, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* **2005**, *391*, 317–323.
42. Chaim, O.M.; da Silveira, R.B.; Trevisan-Silva, D.; Ferrer, V.P.; Sade, Y.B.; Bóia-Ferreira, M.; Gremski, L.H.; Gremski, W.; Senff-Ribeiro, A.; Takahashi, H.K.; Toledo, M.S.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *BBA Mol. Cell Biol. Lipids* **2010**, *1811*, 84–96.
43. Fernandes Pedrosa, M.F.; Junqueira de Azevedo I. de, L.; Goncalves-de-Andrade, R.M.; van den Berg, C.W.; Ramos, C.R.; Ho, P.L.; Tambourgi, D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *298*, 638–645.
44. Tambourgi, D.V.; Magnoli, F.C.; Von Eickstedt, V.R.; Benedetti, Z.C.; Petricevich, V.L.; da Silva, W.D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider

- venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. *J. Immunol.* **1995**, *155*, 4459–4466.
45. Chaves-Moreira, D.; Chaim, O.M.; Sade, Y.B.; Paludo, K.S.; Gremski, L.H.; Donatti, L.; de Moura, J.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; da Silveira, R.B.; Senff-Ribeiro, A.; Veiga, S.S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *107*, 655–666.
46. Kusma, J.; Chaim, O.M.; Wille, A.C.; Ferrer, V.P.; Sade, Y.B.; Donatti, L.; Gremski, W.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie* **2008**, *90*, 1722–1736.
47. Barbaro, K.C.; Sousa, M.V.; Morhy, L.; Eickstedt, V.R.; Mota, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *J. Protein Chem.* **1996**, *15*, 337–343.
48. van Meeteren, L.A.; Frederiks, F.; Giepmans, B.N.; Pedrosa, M.F.; Billington, S.J.; Jost, B.H.; Tambourgi, D.V.; Moolenaar, W.H. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10833–10836.
49. Dragulev, B.; Bao, Y.; Ramos-Cerrillo, B.; Vazquez, H.; Olvera, A.; Stock, R.; Alagon, A.; Fox, J.W. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: Insights into spider venom dermonecrosis. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 1264–1266.
50. Barrett, S.M.; Romine-Jenkins, M.; Blick, K.E. Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 2104–2107.
51. Fernandes-Pedrosa, F.; Junqueira-de-Azevedo, L.; Goncalves-de-Andrade, R.M.; Kobashi, L.S.; Almeida, D.D.; Ho, P.L.; Tambourgi, D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics* **2008**, *9*, 279.
52. da Silveira, R.B.; Wille, A.C.; Chaim, O.M.; Appel, M.H.; Silva, D.T.; Franco, C.R.; Toma, L.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* **2007**, *406*, 355–363.
53. da Silveira, R.B.; dos Santos Filho, J.F.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S.; Gremski, W.; Nader, H.B.; von Dietrich, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon* **2002**, *40*, 815–822.
54. Stocker, W.; Grams, F.; Baumann, U.; Reinemer, P.; Gomis-Ruth, F.X.; McKay, D.B.; Bode, W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 823–840.
55. Wright, R.P.; Elgert, K.D.; Campbell, B.J.; Barrett, J.T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *159*, 415–426.
56. Bommer, U.A.; Thiele, B.J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 379–385.

57. Marsh, N.; Williams, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* **2005**, *45*, 1171–1181.
58. Koh, D.C.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 3030–3041.
59. Bailey, P.; Wilce, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. *Emerg. Med. (Fremantle)* **2001**, *13*, 28–36.
60. Schmidtke, A.; Lotsch, J.; Freynhagen, R.; Geisslinger, G. Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet* **2010**, *375*, 1569–1577.
61. Ramu, Y.; Xu, Y.; Lu, Z. Engineered specific and high-affinity inhibitor for a subtype of inward-rectifier K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10774–10778.
62. Gedulin, B.R.; Smith, P.; Prickett, K.S.; Tryon, M.; Barnhill, S.; Reynolds, J.; Nielsen, L.L.; Parkes, D.G.; Young, A.A. Dose-response for glycaemic and metabolic changes. 28 days after single injection of long-acting release exenatide in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetologia* **2005**, *48*, 1380–1385.
63. Heine, R.J.; Van Gaal, L.F.; Johns, D.; Mihm, M.J.; Widel, M.H.; Brodows, R.G. Exenatide versus insulin glargine in patients with suboptimally controlled type 2 diabetes: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **2005**, *143*, 559–569.
64. Chuang, R.S.; Jaffe, H.; Cribbs, L.; Perez-Reyes, E.; Swartz, K.J. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat. Neurosci.* **1998**, *1*, 668–674.
65. Bagdany, M.; Batista, C.V.; Valdez-Cruz, N.A.; Somodi, S.; Rodriguez de la Vega, R.C.; Licea, A.F.; Varga, Z.; Gaspar, R.; Possani, L.D.; Panyi, G. Anurotoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx. 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1034–1044.
66. Gurevitz, M.; Karbat, I.; Cohen, L.; Ilan, N.; Kahn, R.; Turkov, M.; Stankiewicz, M.; Stuhmer, W.; Dong, K.; Gordon, D. The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. *Toxicon* **2007**, *49*, 473–489.
67. Diochot, S.; Lazdunski, M. Sea anemone toxins affecting potassium channels. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **2009**, *46*, 99–122.
68. Mirshafiey, A. Venom therapy in multiple sclerosis. *Neuropharmacology* **2007**, *53*, 353–361.
69. Norton, R.S.; Pennington, M.W.; Wulff, H. Potassium channel blockade by the sea anemone toxin ShK for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3041–3052.
70. Fletcher, J.I.; Smith, R.; O'Donoghue, S.I.; Nilges, M.; Connor, M.; Howden, M.E.; Christie, M.J.; King, G.F. The structure of a novel insecticidal neurotoxin, omega-atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 559–566.
71. Villanova, F.E.; Andrade, E.; Leal, E.; Andrade, P.M.; Borra, R.C.; Troncone, L.R.; Magalhaes, L.; Leite, K.R.; Paranhos, M.; Claro, J.; Srougi, M. Erection induced by Tx2–6 toxin of *Phoneutria nigriventer* spider: expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice. *Toxicon* **2009**, *54*, 793–801.
72. Andrade, E.; Villanova, F.; Borra, P.; Leite, K.; Troncone, L.; Cortez, I.; Messina, L.; Paranhos, M.; Claro, J.; Srougi, M. Penile erection induced *in vivo* by a purified toxin from the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer*. *BJU Int.* **2008**, *102*, 835–837.

73. Haerberli, S.; Kuhn-Nentwig, L.; Schaller, J.; Nentwig, W. Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon* **2000**, *38*, 373–380.
74. Senff-Ribeiro, A.; Henrique da Silva, P.; Chaim, O.M.; Gremski, L.H.; Paludo, K.S.; Bertoni da Silveira, R.; Gremski, W.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 210–218.
75. Veiga, S.S. Federal University of Paraná, Brazil, Personal communication, 2011.
76. Binford, G.J.; Wells, M.A. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogygne spiders. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *135*, 25–33.
77. Tambourgi, D.V.; Goncalves-de-Andrade, R.M.; van den Berg, C.W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. *Toxicon* **2010**, *56*, 1113–1119.
78. Barbaro, K.C.; Eickstedt, V.R.; Mota, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *Toxicon* **1994**, *32*, 113–120.
79. Mota, I.; Barbaro, K.C. Biological and biochemical properties of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *Toxin Rev.* **1995**, *14*, 401–421.
80. Luciano, M.N.; da Silva, P.H.; Chaim, O.M.; dos Santos, V.L.; Franco, C.R.; Soares, M.F.; Zanata, S.M.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **2004**, *52*, 455–467.
81. Paixao-Cavalcante, D.; van den Berg, C.W.; de Freitas Fernandes-Pedrosa, M.; Goncalves de Andrade, R.M.; Tambourgi, D.V. Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by *Loxosceles* venom sphingomyelinase D. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 61–68.
82. McGlasson, D.L.; Green, J.A.; Stoecker, W.V.; Babcock, J.L.; Calcara, D.A. Duration of *Loxosceles reclusa* venom detection by ELISA from swabs. *Clin. Lab. Sci.* **2009**, *22*, 216–222.
83. Vetter, R.S. Arachnids misidentified as brown recluse spiders by medical personnel and other authorities in North America. *Toxicon* **2009**, *54*, 545–547.
84. Reitz, M. Diagnosis of brown recluse spider bites is overused. *Am. Fam. Physician* **2007**, *76*, 943–944.
85. Pauli, I.; Minozzo, J.C.; da Silva, P.H.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the Brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon* **2009**, *53*, 660–671.
86. Pauli, I.; Puka, J.; Gubert, I.C.; Minozzo, J.C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon* **2006**, *48*, 123–137.
87. Dias-Lopes, C.; Guimaraes, G.; Felicori, L.; Fernandes, P.; Emery, L.; Kalapothakis, E.; Nguyen, C.; Molina, F.; Granier, C.; Chavez-Olortegui, C. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. *Toxicon* **2010**, *55*, 481–487.
88. Felicori, L.; Fernandes, P.B.; Giusta, M.S.; Duarte, C.G.; Kalapothakis, E.; Nguyen, C.; Molina, F.; Granier, C.; Chavez-Olortegui, C. An *in vivo* protective response against toxic effects of the

- dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. *Vaccine* **2009**, *27*, 4201–4208.
89. Gomez, H.F.; Krywko, D.M.; Stoecker, W.V. A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. *Ann. Emerg. Med.* **2002**, *39*, 469–474.
 90. Krywko, D.M.; Gomez, H.F. Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: A comparison of 4 venom recovery methods. *Ann. Emerg. Med.* **2002**, *39*, 475–480.
 91. McDermott, M.; Wakelam, M.J.; Morris, A.J. Phospholipase D. *Biochem. Cell. Biol.* **2004**, *82*, 225–253.
 92. Gomez-Cambrero, J. New concepts in phospholipase D signaling in inflammation and cancer. *Sci. World J.* **2010**, *10*, 1356–1369.
 93. Roth, M.G. Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* **2008**, *9*, 1233–1239.
 94. Huwiler, A.; Kolter, T.; Pfeilschifter, J.; Sandhoff, K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1485*, 63–99.
 95. Mitsutake, S.; Igarashi, Y. Transbilayer movement of ceramide in the plasma membrane of live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *359*, 622–627.
 96. Rodrigues, R.S.; Izidoro, L.F.; de Oliveira, R.J., Jr.; Sampaio, S.V.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M. Snake venom phospholipases A2: A new class of antitumor agents. *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 894–898.
 97. Su, W.; Chen, Q.; Frohman, M.A. Targeting phospholipase D with small-molecule inhibitors as a potential therapeutic approach for cancer metastasis. *Future Oncol.* **2009**, *5*, 1477–1486.
 98. Majd, S.; Yusko, E.C.; MacBriar, A.D.; Yang, J.; Mayer, M. Gramicidin pores report the activity of membrane-active enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16119–16126.
 99. Ramu, Y.; Xu, Y.; Lu, Z. Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels. *Nature* **2006**, *442*, 696–699.
 100. Menzel, E.J.; Farr, C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: Biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett.* **1998**, *131*, 3–11.
 101. Cramer, J.A.; Bailey, L.C.; Bailey, C.A.; Miller, R.T. Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1200*, 315–321.
 102. Girish, K.S.; Kemparaju, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci.* **2007**, *80*, 1921–1943.
 103. Kemparaju, K.; Girish, K.S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochem. Funct.* **2006**, *24*, 7–12.
 104. Magalhaes, M.R.; da Silva, N.J., Jr.; Ulhoa, C.J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization. *Toxicon* **2008**, *51*, 1060–1067.
 105. Girish, K.S.; Kemparaju, K. A low molecular weight isoform of hyaluronidase: purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization. *Biochemistry (Mosc)* **2005**, *70*, 708–712.
 106. Markovic-Housley, Z.; Miglierini, G.; Soldatova, L.; Rizkallah, P.J.; Muller, U.; Schirmer, T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure* **2000**, *8*, 1025–1035.
 107. Skov, L.K.; Seppala, U.; Coen, J.J.; Crickmore, N.; King, T.P.; Monsalve, R.; Kastrup, J.S.; Spangfort, M.D.; Gajhede, M. Structure of recombinant Ves v. 2 at 2.0 Angstrom resolution:

- structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 595–604.
108. Tan, N.H.; Ponnudurai, G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C* **1992**, *103*, 299–302.
 109. Kaiser, E. Trypsin and hyaluronidase inhibitor of human serum; the inhibition of the proteolytic and hyaluronic acid cleavage enzymes of snake and spider venoms by human serum. *Biochem. J.* **1953**, *324*, 344–350.
 110. Nagaraju, S.; Devaraja, S.; Kemparaju, K. Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. *Toxicon* **2007**, *50*, 383–393.
 111. Rash, L.D.; Hodgson, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* **2002**, *40*, 225–254.
 112. Kuhn-Nentwig, L.; Schaller, J.; Nentwig, W. Biochemistry, toxicology and ecology of the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Toxicon* **2004**, *43*, 543–553.
 113. Nagaraju, S.; Mahadeswaraswamy, Y.H.; Girish, K.S.; Kemparaju, K. Venom from spiders of the genus *Hippasa*: Biochemical and pharmacological studies. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *144*, 1–9.
 114. Rocha-e-Silva, T.A.A.; Sutti, R.; Hyslop, S. Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon* **2009**, *53*, 153–161.
 115. Zobel-Thropp, P.A.; Bodner, M.R.; Binford, G.J. Comparative analyses of venoms from American and African *Sicarius* spiders that differ in sphingomyelinase D activity. *Toxicon* **2010**, *55*, 1274–1282.
 116. Goolsby, T.V.; Lombardo, F.A. Extravasation of Chemotherapeutic Agents: Prevention and Treatment. *Semin. Oncol.* **2006**, *33*, 139–143.
 117. Dunn, A.L.; Heavner, J.E.; Racz, G.; Day, M. Hyaluronidase: A review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2010**, *10*, 127–131.
 118. Muchmore, D.B.; Vaughn, D.E. Review of the mechanism of action and clinical efficacy of recombinant human hyaluronidase coadministration with current prandial insulin formulations. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2010**, *4*, 419–428.
 119. Etesse, B.; Beaudroit, L.; Deleuze, M.; Nouvellon, E.; Ripart, J. Hyaluronidase: Here we go again. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **2009**, *28*, 658–665.
 120. Misbah, S.; Sturzenegger, M.H.; Borte, M.; Shapiro, R.S.; Wasserman, R.L.; Berger, M.; Ochs, H.D. Subcutaneous immunoglobulin: opportunities and outlook. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *158*, 51–59.
 121. Lokeshwar, V.B.; Selzer, M.G. Hyaluronidase: Both a tumor promoter and suppressor. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18*, 281–287.
 122. Barla, F.; Higashijima, H.; Funai, S.; Sugimoto, K.; Harada, N.; Yamaji, R.; Fujita, T.; Nakano, Y.; Inui, H. Inhibitive effects of alkyl gallates on hyaluronidase and collagenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 2335–2337.
 123. Shuster, S.; Frost, G.I.; Csoka, A.B.; Formby, B.; Stern, R. Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 192–197.

124. Botzki, A.; Rigden, D.J.; Braun, S.; Nukui, M.; Salmen, S.; Hoechstetter, J.; Bernhardt, G.; Dove, S.; Jedrzejewski, M.J.; Buschauer, A. L-Ascorbic acid. 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 45990–45997.
125. Calvete, J.J. Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. *J. Proteomics* **2009**, *72*, 121–126.
126. Escoubas, P.; King, G.F. Venomics as a drug discovery platform. *Expert Rev. Proteomics* **2009**, *6*, 221–224.
127. Gross, B.; Gaestel, M.; Bohm, H.; Bielka, H. cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor. *Protein Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 8367.
128. MacDonald, S.M.; Rafnar, T.; Langdon, J.; Lichtenstein, L.M. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* **1995**, *269*, 688–690.
129. Choi, K.W.; Hsu, Y.C. To cease or to proliferate: New insights into TCTP function from a Drosophila study. *Cell Adh. Migr.* **2007**, *1*, 129–130.
130. Sun, J.; Wu, Y.; Wang, J.; Ma, F.; Liu, X.; Li, Q. Novel translationally controlled tumor protein homologue in the buccal gland secretion of *Lampetra japonica*. *Biochimie* **2008**, *90*, 1760–1768.
131. Gachet, Y.; Tournier, S.; Lee, M.; Lazaris-Karatzas, A.; Poulton, T.; Bommer, U.A. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell. Sci.* **1999**, *112*, 1257–1271.
132. Bazile, F.; Pascal, A.; Arnal, I.; Le Clainche, C.; Chesnel, F.; Kubiak, J.Z. Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 555–565.
133. Yarm, F.R. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 6209–6221.
134. Cans, C.; Passer, B.J.; Shalak, V.; Nancy-Portebois, V.; Crible, V.; Amzallag, N.; Allanic, D.; Tufino, R.; Argentini, M.; Moras, D.; Fiucci, G.; Goud, B.; Mirande, M.; Amson, R.; Telerman, A. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13892–13897.
135. Liu, H.; Peng, H.W.; Cheng, Y.S.; Yuan, H.S.; Yang-Yen, H.F. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 3117–3126.
136. Li, F.; Zhang, D.; Fujise, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic. *Protein J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47542–47549.
137. Amzallag, N.; Passer, B.J.; Allanic, D.; Segura, E.; Thery, C.; Goud, B.; Amson, R.; Telerman, A. TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein-histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46104–46112.
138. Jung, J.; Kim, M.; Kim, M.J.; Kim, J.; Moon, J.; Lim, J.S.; Kim, M.; Lee, K. Translationally controlled tumor protein interacts with the third cytoplasmic domain of Na,K-ATPase alpha subunit and inhibits the pump activity in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 49868–49875.
139. Yang, Y.; Yang, F.; Xiong, Z.; Yan, Y.; Wang, X.; Nishino, M.; Mirkovic, D.; Nguyen, J.; Wang, H.; Yang, X.F. An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* **2005**, *24*, 4778–4788.

140. Burgess, A.; Labbe, J.C.; Vigneron, S.; Bonneaud, N.; Strub, J.M.; Van Dorselaer, A.; Lorca, T.; Castro, A. Chfr interacts and colocalizes with TCTP to the mitotic spindle. *Oncogene* **2008**, *27*, 5554–5566.
141. Chen, S.H.; Wu, P.S.; Chou, C.H.; Yan, Y.T.; Liu, H.; Weng, S.Y.; Yang-Yen, H.F. A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 2525–2532.
142. Hsu, Y.; Chern, J.J.; Cai, Y.; Liu, M.; Choi, K.W. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* **2007**, *445*, 785–788.
143. Bheekha-Escura, R.; MacGlashan Jr, D.W.; Langdon, J.M.; MacDonald, S.M. Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14–3D10. *Blood* **2000**, *96*, 2191.
144. Kang, H.S.; Lee, M.J.; Song, H.; Han, S.H.; Kim, Y. M.; Im, J.Y.; Choi, I. Molecular Identification of IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor as a B Cell Growth Factor. 1. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 6545–6554.
145. Hinojosa-Moya, J.; Xoconostle-Cazares, B.; Piedra-Ibarra, E.; Mendez-Tenorio, A.; Lucas, W.J.; Ruiz-Medrano, R. Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. *J. Mol. Evol.* **2008**, *66*, 472–483.
146. Mulenga, A.; Azad, A.F. The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. *Exp. Appl. Acarology* **2005**, *37*, 215–229.
147. Rattmann, Y.D.; Pereira, C.R.; Cury, Y.; Gremski, W.; Marques, M.C.A.; da Silva-Santos, J.E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: Involvement of mast cell degranulation, histamine and. 5-HT receptors. *Toxicon* **2008**, *51*, 363–372.
148. Rash, L.D.; King, R.G.; Hodgson, W.C. Evidence that histamine is the principal pharmacological component of venom from an Australian wolf spider (*Lycosa godeffroyi*). *Toxicon* **1998**, *36*, 367–375.
149. Paludo, K.S.; Biscaia, S.M.; Chaim, O.M.; Otuki, M.F.; Naliwaiko, K.; Dombrowski, P.A.; Franco, C.R.; Veiga, S.S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: A pharmacological investigation. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *149*, 323–333.
150. Weisel-Eichler, A.; Libersat, F. Venom effects on monoaminergic systems. *J. Comp. Physiol. A Neuroethology Sens. Neural Behav. Physiol.* **2004**, *190*, 683–690.
151. Rattmann, Y.D.; Pereira, C.R.; Cury, Y.; Gremski, W.; Marques, M.C.; da Silva-Santos, J.E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and. 5-HT receptors. *Toxicon* **2008**, *51*, 363–372.
152. Gnanasekar, M.; Rao, K.V.; Chen, L.; Narayanan, R.B.; Geetha, M.; Scott, A.L.; Ramaswamy, K.; Kaliraj, P. Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *121*, 107–118.
153. MacDonald, S.M.; Bhisutthibhan, J.; Shapiro, T.A.; Rogerson, S.J.; Taylor, T.E.; Tembo, M.; Langdon, J.M.; Meshnick, S.R. Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a

- functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10829–10832.
154. Rao, K.V.; Chen, L.; Gnanasekar, M.; Ramaswamy, K. Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 31207–31213.
155. Efferth, T. Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin—From bench to bedside. *Planta Med.* **2007**, *73*, 299.
156. Susini, L.; Besse, S.; Duflaut, D.; Lespagnol, A.; Beekman, C.; Fiucci, G.; Atkinson, A.R.; Busso, D.; Poussin, P.; Marine, J.C.; Martinou, J.C.; Cavarelli, J.; Moras, D.; Amson, R.; Telerman, A. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 1211–1220.
157. Gnanasekar, M.; Thirugnanam, S.; Zheng, G.; Chen, A.; Ramaswamy, K. Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2009**, *34*, 1241–1246.
158. Telerman, A.; Amson, R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 206–216.
159. Tuynder, M.; Fiucci, G.; Prieur, S.; Lespagnol, A.; Geant, A.; Beaucourt, S.; Duflaut, D.; Besse, S.; Susini, L.; Cavarelli, J.; Moras, D.; Amson, R.; Telerman, A. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15364–15369.
160. Slaby, O.; Sobkova, K.; Svoboda, M.; Garajova, I.; Fabian, P.; Hrstka, R.; Nenutil, R.; Sachlova, M.; Kocakova, I.; Michalek, J.; Smerdova, T.; Knoflickova, D.; Vyzula, R. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol. Rep.* **2009**, *21*, 1235–1241.
161. Ma, Q.; Geng, Y.; Xu, W.; Wu, Y.; He, F.; Shu, W.; Huang, M.; Du, H.; Li, M. The Role of Translationally Controlled Tumor Protein in Tumor Growth and Metastasis of Colon Adenocarcinoma Cells. *J. Proteome. Res.* **2009**, *9*, 40–49.
162. Tuynder, M.; Susini, L.; Prieur, S.; Besse, S.; Fiucci, G.; Amson, R.; Telerman, A. Biological models and genes of tumor reversion: Cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14976–14981.
163. Efferth, T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* **2005**, *8*, 85–97.
164. Kim, J.E.; Koo, K.H.; Kim, Y.H.; Sohn, J.; Park, Y.G. Identification of potential lung cancer biomarkers using an in vitro carcinogenesis model. *Exp. Mol. Med.* **2008**, *40*, 709–720.
165. van de Sande, W.W.; Janse, D.J.; Hira, V.; Goedhart, H.; van der Zee, R.; Ahmed, A.O.; Ott, A.; Verbrugh, H.; van Belkum, A. Translationally controlled tumor protein from *Madurella mycetomatis*, a marker for tumorous mycetoma progression. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 1997–2005.
166. Zhu, W.L.; Cheng, H.X.; Han, N.; Liu, D.L.; Zhu, W.X.; Fan, B.L.; Duan, F.L. Messenger RNA expression of translationally controlled tumor protein (TCTP) in liver regeneration and cancer. *Anticancer Res.* **2008**, *28*, 1575–1580.
167. Rinnerthaler, M.; Jarolim, S.; Heeren, G.; Palle, E.; Perju, S.; Klinger, H.; Bogengruber, E.; Madeo, F.; Braun, R.J.; Breitenbach-Koller, L.; Breitenbach, M.; Laun, P. MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has

- apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1757*, 631–638.
168. Zanetti, V.C.; da Silveira, R.B.; Dreyfuss, J.L.; Haoach, J.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S.; Gremski, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2002**, *13*, 135–148.
169. Gomis-Rüth, F. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* **2003**, *24*, 157–202.
170. Sterchi, E.E. Special issue: Metzincin metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* **2008**, *29*, 255–257.
171. Becker-Pauly, C.; Bruns, B.C.; Damm, O.; Schutte, A.; Hammouti, K.; Burmester, T.; Stocker, W. News from an ancient world: two novel astacin metalloproteases from the horseshoe crab. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 236–248.
172. Sarraz, M.P., Jr., BMP-1 and the astacin family of metalloproteinases: A potential link between the extracellular matrix, growth factors and pattern formation. *Bioessays* **1996**, *18*, 439–442.
173. Mohrlen, F.; Hutter, H.; Zwillig, R. The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4909–4920.
174. Bode, W.; Gomis-Ruth, F.X.; Stockler, W. Astacins, serralsins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* **1993**, *331*, 134–140.
175. Bond, J.S.; Beynon, R.J. The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1247–1261.
176. Stocker, W.; Zwillig, R. Astacin. *Methods Enzymol.* **1995**, *248*, 305–325.
177. Stocker, W.; Bode, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: The metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 383–390.
178. Dumermuth, E.; Sterchi, E.E.; Jiang, W.P.; Wolz, R.L.; Bond, J.S.; Flannery, A.V.; Beynon, R.J. The astacin family of metalloendopeptidases. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 21381–21385.
179. Sharma, V.K.; Teoh, H.L.; Wong, L.Y.; Su, J.; Ong, B.K.; Chan, B.P. Recanalization therapies in acute ischemic stroke: pharmacological agents, devices, and combinations. *Stroke Res. Treat.* **2010**, in press.
180. Gao, F.; Kiesewetter, D.; Chang, L.; Ma, K.; Rapoport, S.I.; Igarashi, M. Whole-body synthesis secretion of docosahexaenoic acid from circulating eicosapentaenoic acid in unanesthetized rats. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 2463–2470.
181. Rash, L.D.; Hodgson, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* **2002**, *40*, 225–254.
182. Nicholson, G.M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon* **2007**, *49*, 490–512.
183. De Lima, M.E.; Figueiredo, S.G.; Pimenta, A.M.; Santos, D.M.; Borges, M.H.; Cordeiro, M.N.; Richardson, M.; Oliveira, L.C.; Stankiewicz, M.; Pelhate, M. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146*, 264–279.
184. Sollod, B.L.; Wilson, D.; Zhaxybayeva, O.; Gogarten, J.P.; Drinkwater, R.; King, G.F. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides* **2005**, *26*, 131–139.

185. Grishin, E. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 276–280.
186. Escoubas, P.; Diochot, S.; Corzo, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie* **2000**, *82*, 893–907.
187. Dutra, A.A.; Sousa, L.O.; Resende, R.R.; Brandao, R.L.; Kalapothakis, E.; Castro, I.M. Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiadora* sp. effecting on calcium channels. *Peptides* **2008**, *29*, 1505–1513.
188. Norton, R.S.; Pallaghy, P.K. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* **1998**, *36*, 1573–1583.
189. Schalle, J.; Kampfer, U.; Schurch, S.; Kuhn-Nentwig, L.; Haeberli, S.; Nentwig, W. CSTX-9, a toxic peptide from the spider *Cupiennius salei*: amino acid sequence, disulphide bridge pattern and comparison with other spider toxins containing the cystine knot structure. *Cell Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1538–1545.
190. Mouhat, S.; Jouirou, B.; Mosbah, A.; De Waard, M.; Sabatier, J.M. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* **2004**, *378*, 717–726.
191. Corzo, G.; Escoubas, P. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cell Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2409–2426.
192. Corzo, G.; Escoubas, P.; Stankiewicz, M.; Pelhate, M.; Kristensen, C.P.; Nakajima, T. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of δ -palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5783–5795.
193. Tedford, H.W.; Sollod, B.L.; Maggio, F.; King, G.F. Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. *Toxicon* **2004**, *43*, 601–618.
194. Black, B.C.; Brennam, L.A.; Dierks, P.M.; Gard, I.E. Commercialization of baculoviral insecticides. In *The Baculoviruses* (Miller, Lois). In *The Viruses*; Plenum Press: New York, NY, USA, 1997; pp. 341–347.
195. Neurath, H. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 268–271.
196. Otlewski, J.; Krowarsch, D.; Apostoluk, W. Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* **1999**, *46*, 531–565.
197. Rimphanitchayakit, V.; Tassanakajon, A. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Dev. Comp. Immunol.* **2010**, *34*, 377–386.
198. Laskowski, M., Jr.; Kato, I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 593–626.
199. Krowarsch, D.; Cierpicki, T.; Jelen, F.; Otlewski, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2427–2444.
200. Irving, J.A.; Pike, R.N.; Lesk, A.M.; Whisstock, J.C. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* **2000**, *10*, 1845–1864.
201. Law, R.H.; Zhang, Q.; McGowan, S.; Buckle, A.M.; Silverman, G.A.; Wong, W.; Rosado, C.J.; Langendorf, C.G.; Pike, R.N.; Bird, P.I.; Whisstock, J.C. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* **2006**, *7*, 216.
202. Takahashi, H.; Iwanaga, S.; Suzuki, T. Distribution of proteinase inhibitors in snake venoms. *Toxicon* **1974**, *12*, 193–197.

203. Shafqat, J.; Beg, O.U.; Yin, S.J.; Zaidi, Z.H.; Jornvall, H. Primary structure and functional properties of cobra (*Naja naja naja*) venom Kunitz-type trypsin inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 337–341.
204. Shafqat, J.; Zaidi, Z.H.; Jornvall, H. Purification and characterization of a chymotrypsin Kunitz inhibitor type of polypeptide from the venom of cobra (*Naja naja naja*). *FEBS Lett.* **1990**, *275*, 6–8.
205. Chang, L.; Chung, C.; Huang, H.B.; Lin, S. Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *283*, 862–867.
206. Chen, C.; Hsu, C.H.; Su, N.Y.; Lin, Y.C.; Chiou, S.H.; Wu, S.H. Solution structure of a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor isolated from the elapid snake *Bungarus fasciatus*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45079–45087.
207. Lu, X.Z.; Zou, Y.G.; Yin, X.M.; Chen, W.T.; Zhang, C.P. Expression of MMP1 mRNA in oral squamous cell carcinoma and paired normal tissues. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2008**, *28*, 1362–1364.
208. Zhou, X.D.; Jin, Y.; Lu, Q.M.; Li, D.S.; Zhu, S.W.; Wang, W.Y.; Xiong, Y.L. Purification, characterization and primary structure of a chymotrypsin inhibitor from *Naja atra* venom. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *137*, 219–224.
209. He, D.; Natarajan, V.; Stern, R.; Gorshkova, I.A.; Solway, J.; Spannhake, E.W.; Zhao, Y. Lysophosphatidic acid-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E(2) release via C/EBPbeta in human bronchial epithelial cells. *Biochem. J.* **2008**, *412*, 153–162.
210. Millers, E.K.; Trabi, M.; Masci, P.P.; Lavin, M.F.; de Jersey, J.; Guddat, L.W., Crystal structure of textilinin-1, a Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). *FEBS J.* **2009**, *276*, 3163–3175.
211. Flight, S.M.; Johnson, L.A.; Trabi, M.; Gaffney, P.; Lavin, M.; de Jersey, J.; Masci, P. Comparison of textilinin-1 with aprotinin as serine protease inhibitors and as antifibrinolytic agents. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **2005**, *34*, 188–193.
212. Flight, S.M.; Johnson, L.A.; Du, Q.S.; Warner, R.L.; Trabi, M.; Gaffney, P.J.; Lavin, M.F.; de Jersey, J.; Masci, P.P. Textilinin-1, an alternative anti-bleeding agent to aprotinin: Importance of plasmin inhibition in controlling blood loss. *Br. J. Haematol.* **2009**, *145*, 207–211.
213. Zhao, Y.; Jin, Y.; Wei, S.S.; Lee, W.H.; Zhang, Y. Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andrewsi*. *Toxicon* **2005**, *46*, 635–640.
214. Yuan, C.H.; He, Q.Y.; Peng, K.; Diao, J.B.; Jiang, L.P.; Tang, X.; Liang, S.P. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. *PLoS One* **2008**, *3*, e3414.
215. Duarte, M.M.; Montes De Oca, H.; Diniz, C.R.; Fortes-Dias, C.L. Primary culture of venom gland cells from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* **1999**, *37*, 1673–1682.
216. Yamanouye, N.; Kerchove, C.M.; Moura-da-Silva, A.M.; Carneiro, S.M.; Markus, R.P. Long-term primary culture of secretory cells of *Bothrops jararaca* venom gland for venom production in vitro. *Nat. Protocols* **2007**, *1*, 2763–2766.

217. Silva, L.M.; Lages, C.P.; Venuto, T.; Lima, R.M.; Diniz, M.V.; Valentim, C.L.L.; Baba, E.H.; Pimenta, P.F.P.; Fortes-Dias, C.L. Primary culture of venom glands from the Brazilian armed spider, *Phoneutria nigriventer* (Araneae, Ctenidae). *Toxicon* **2008**, *51*, 428–434.
218. Domingos, M.O.; Barbaro, K.C.; Tynan, W.; Penny, J.; Lewis, D.J.; New, R.R. Influence of sphingomyelin and TNF- α release on lethality and local inflammatory reaction induced by *Loxosceles gaucho* spider venom in mice. *Toxicon* **2003**, *42*, 471–479.
219. Barbaro, K.C.; Lira, M.S.; Araujo, C.A.; Pareja-Santos, A.; Tavora, B.C.; Prezotto-Neto, J.P.; Kimura, L.F.; Lima, C.; Lopes-Ferreira, M.; Santoro, M.L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon* **2010**, *56*, 972–979.
220. Burgess, R.R.; Richard, R.B.; Murray, P.D. Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Salt Lake City, UT, USA, 2009; Volume 463, Chapter. 17, pp. 259–282.
221. Daly, R.; Hearn, M.T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18*, 119–138.
222. Benting, J.; Lecat, S.; Zacchetti, D.; Simons, K. Protein Expression in *Drosophila* Schneider Cells. *Anal. Biochem.* **2000**, *278*, 59–68.
223. Rohrmann, G.F. *Baculovirus Molecular Biology*; European Molecular Biology Organization: Corvallis, OR, USA, 2008.
224. Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotech.* **2004**, *22*, 1393–1398.
225. Escoubas, P.; Sollod, B.; King, G.F. Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon* **2006**, *47*, 650–663.
226. Murakami, M.T.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; Tambourgi, D. V.; Arni, R.K. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13658–13664.

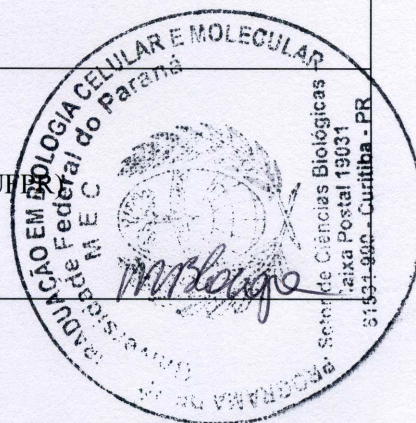


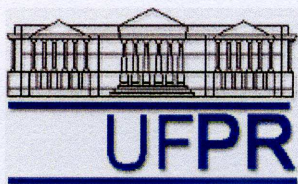
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular, Molecular e
Fisiologia



HISTÓRICO ESCOLAR - DOUTORADO

Aluno(a): Daniele Chaves Moreira	Matrícula:
Curso: Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular	
Instituição: Universidade Federal do Paraná	
Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular	
Nível: Doutorado	
Data de Matrícula no Curso: Setembro de 2008	
Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga	
Conceito do Curso: 5 (Portaria do MEC 524. DOU 30/04/2008 – Parecer CES/CNE 33/2008 – 29/04/2008).	
Curso reconhecido pela Portaria nº 8531/01-72, da Resolução Nº: 89/01 A-CEPE - Currículo disciplinas: 2005/20057.	
Mudança de Nível: Mestrado para o Doutorado: Setembro de 2008	
Código / Disciplinas Cursadas Mestrado	Ano C. H. N. Cred Conc.
BC-756 Biologia Celular	2007 120 08 A
BC-757 Seminários	2007 30 02 A
BC-784 Fundamentos em Biologia Molecular	2007 60 04 A
BC-773 Técnicas Básicas em Microscopia	2007 90 05 A
BF-272 Sinalização Intracelular	2007 45 02 A
BC-770 Matriz Extracelular	2007 45 03 A
BC-783 Estágio de Docência em Biologia Celular	2007 60 02 A
BC-744 Imunocitoquímica/Imunofluorescência	2008 45 03 A
Código / Disciplinas Cursadas Doutorado	Ano C. H. N. Cred Conc.
BC- 796 Tópicos Contemporâneos em Biologia Celular e Molecular - Seminários	2009 15 01 A
BQ-772 Métodos de Análise de Proteínas (Pós-Bioquímica-UFPR.	2009 90 03 A
BQ-744 Análise Conformacional de Proteínas	2009 60 03 A
BC-787 Biologia Computacional	2009 90 05 A
Total Créditos / Carga Horaria Cursados(a) M/D:	750 41
Exame de proficiência em Inglês: 12 de abril de 2008 - Aprovada	
Exame de Proficiência na língua Espanhola: NC/UFPR Maio de 2011	
(A=9,0 a 10,0) (B=8,0 a 8,9) (C=7,0 a 7,9) (D=Zero a 6,9)	
Serão considerados aprovados em disciplinas, os candidatos que lograrem os conceitos A, B, ou C . Obter no mínimo 36 créditos em disciplinas .	
Data da Defesa da Tese:	
Título: “	
Resultado Final:	
Nome:	Composição da Banca Examinadora
	Instituição:
Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga (Orientador da Universidade Federal do Paraná - UFPR)	





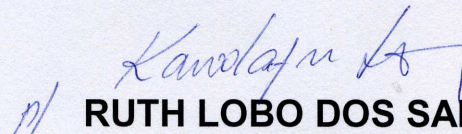
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DECLARAÇÃO

Declaramos para fins de comprovação junto a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR / DOUTORADO que nada consta em nossos registros referente a débito por parte de **DANIELE CHAVES MOREIRA** nesta biblioteca.

E, por ser verdade firmo a presente.

Curitiba, 4 de agosto de 2011


RUTH LOBO DOS SANTOS
Bibliotecária/Chefe



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê Setorial de Ética em Pesquisa



Projeto: "Estudo dos mecanismos moleculares da atividade hemolítica do veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)".

Pesquisador: Daniele Chaves Moreira

Departamento: Departamento de Biologia Celular e Molecular

Curitiba, 12 de dezembro de 2007

Prezada Daniele Chaves Moreira

Em relação a projeto acima citado, venho informá-lo de que este foi avaliado pelo CEP-Biológicas, estando de acordo com a Declaração de Helsinque (e suas atualizações) e com a resolução 196/96 do CNS (e resoluções complementares), tendo sido aprovado pelo comitê. Portanto, a partir desta data poderá ser iniciada a execução e a coleta de dados do referido projeto.

Ressalto que, de acordo com a resolução 196/96 que: (a) o pesquisador deve comunicar a este comitê qualquer alteração no protocolo experimental ou no termo de consentimento (nestas circunstâncias a inclusão deve ser temporariamente suspensa até análise do CEP das modificações propostas); (b) comunicar imediatamente ao CEP qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; (c) os dados individuais de todos indivíduos devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria; (d) apresentar relatórios semestrais.

Contando com sua compreensão e apoio, coloco-me à disposição para maiores esclarecimentos, atenciosamente

Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisas
Setor de Ciências Biológicas - UFPR

CERTIFICADO

N.º 245

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA N.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

APROVADO.

PROCESSO: 23075.025031/2007-80

RO 06/2007 - 31/07/2007

TÍTULO: Bioprospecção e caracterização da atividade biológica de toxinas presentes no veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)

AUTORES: Sílvio Sanches Veiga, Waldemiro Gremski, Paulo Henrique da Silva, Rafael Bertoni da Silveira, Márcia Helena Appel, Helena Bonciani Nader, Olga Meiri Chaim, Daniele Chaves Moreira

DEPARTAMENTO: Biologia Celular

Curitiba, 09 de agosto de 2007.



Profª. Ana Maria Caliman Filadelfi
Coordenadora do CEEA